

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 31, ISSUE 2/2004
(213–396)

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, cytoszkielet, 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-KACZMAREK – 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, hybrydocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 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, 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, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

Indexed in: National Library of Medicine, Bathesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey.

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 Zeszytcie

1. Mimo znaczącego postępu metodologicznego, zapewnienie pełnego bezpieczeństwa terapii genowej jest wciąż wyzwaniem wymagającym dalszych badań. Stosowane dotąd wektory genowe zarówno wirusowe, jak i biochemiczne charakteryzują się pewnymi ograniczeniami i zagrożeniami. Dyskusję tych problemów znajdzie Czytelnik na stronie 245.
2. Lipidy są ważnym elementem strukturalnym i funkcjonalnym układu błonowego komórki. Obserwowano wpływ tłumienia aktywności *in vitro* wyizolowanych i oczyszczonych polimeraz związanych z metabolizmem DNA przez kwasy tłuszczowe, lipidy złożone oraz produkty peroksydacji lipidów. Autorzy artykułu na stronie 277 sugerują, że lipidy mogą stanowić część składową mechanizmu kontrolującego proliferację i różnicowanie komórek *in vivo*, chociaż droga do udowodnienia tego postulatu wydaje się jeszcze długa.
3. Zaburzenia ekspresji i działania ligaz ubikwitynowych mogą leżeć u podstaw różnych schorzeń. W artykule na stronie 373 omówiono funkcje ligaz ubikwitynowych dołączających ubikwitynę do białek przeznaczonych do degradacji w proteasomie. Coraz częściej również kompleks sygnałowy COP9 (*C*onstitutive *P*hotomorphogenic 9) wiązany jest z kontrolą zależnej od ubikwityny degradacji białek. Kompleks COP9 współdziała z trzema ligazami ubikwitynowymi: SCF, MDM2 i COP1, o czym bliżej informuje artykuł na stronie 259.
4. Ciała Cajala (CB) po raz pierwszy opisano 100 lat temu w neuronach ssaków. CB są wysoce konserwatywną strukturą występującą w komórkach somatycznych i generatywnych roślin oraz zwierząt. Białkiem znacznikowym CB jest koilina. CB prawdopodobnie uczestniczą w biogenezie małych jądrowych RNA (snRNA). Więcej na ten temat można znaleźć na stronie 311.
5. W artykule na stronie 331 dokonano ogólnej charakterystyki białek szoku cieplnego (HSP) zwracając uwagę na ich szczególny udział w modyfikowaniu odpowiedzi immunologicznej oraz możliwy związek z wieloma stanami chorobowymi. HSP należą do białek o bardzo konserwatywnej sekwencji aminokwasowej. Chronią komórki prokariotyczne i eukariotyczne przed szkodliwymi konsekwencjami metabolitycznymi i środowiskowymi, biorąc udział w fałdowaniu i rozplataniu łańcuchów polipeptydowych, ich oligomeryzacji, translokacji oraz degradacji.

WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 30 Z ROKU 2003
REFEREES OF THE VOLUME 30, 2003

Prof. dr hab. Barbara Bilińska
Dr Anna Ciemierych-Litwinienko
Prof. dr hab. Zofia Błach-Olszewska
Prof. dr hab. Franciszek Dubert
Prof. dr hab. Barbara Gabara
Prof. dr hab. Wojciech Gorczyca
Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak
Prof. dr hab. Ewa Gregoraszczuk
Prof. dr hab. Barbara Grzelakowska-Sztabert
Prof. dr hab. Lila Hryniewiecka
Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek
Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek
Prof. dr hab. Jerzy Kawiak
Prof. dr hab. Zbigniew Kmieć
Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska-Korczak
Dr Marcin Majka
Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela
Prof. dr hab. Stanisław Moskałewski

Doc. dr hab. Barbara Nawrot
Prof. dr hab. Jerzy Nowak
Prof. dr hab. Maria Olszewska
Prof. dr hab. Zofia Osuchowska
Prof. dr hab. Marek Pawlikowski
Prof. dr hab. Barbara Płytycz
Prof. dr hab. Mariusz Ratajczak
Prof. dr hab. Lidia Różewicka
Prof. dr hab. Zenon Sznajder
Prof. dr hab. Michał Sikorski
Prof. dr hab. Ryszard Słomski
Prof. dr hab. Jan Steffen
Prof. dr hab. Andrzej Szutowicz
Prof. dr hab. Maria Śmiałowska
Prof. dr hab. Barbara Tomaszewska
Prof. dr hab. Andrzej Trętyn
Prof. dr hab. Wiesław Trzeciak
Prof. dr hab. Tomasz Twardowski
Prof. dr hab. Maciej Zabel
Prof. dr hab. Jan Żeromski

WSPOMNIENIE O PROFESORZE JÓZEFIE KAŁUŻY 10.03.1929–26.07.2003

26 lipca 2003 r. dotarła do nas wiadomość o nagłej śmierci prof. dr hab. Józefa Kałuży. Dla wszystkich, którzy znali Profesora Kałużę, była to nieoczekiwana i smutna wiadomość, biorąc pod uwagę jego energię, witalność oraz twórczość naukową. Profesor J. Kałuża był człowiekiem wielkiej wiedzy i prawości. W dziedzinie neuropatologii w Polsce stanowił nieoceniony autorytet naukowy będąc również jednym z najlepszych diagnostów.

Urodził się 10 marca 1929 roku w Knurowie na Śląsku, gdzie spędził dzieciństwo. W trudnym czasie wojny 13-letniemu dziecku, żyjącemu na terenie wcielonym do III Rzeszy, zabroniono chodzić do szkoły i zmuszono do pracy. Jak wspominał, jego matka, aby uchronić rodzinę przed dalszymi represjami dając łapówkę w postaci pięknego dywanu “załatwiła” mu kształcenie zawodowe i pracę pomocnika elektryka w niemieckim przedsiębiorstwie. Był to też czas kształtowania jego patriotyzmu, przede wszystkim w rodzinnym domu, pielęgnującym polskie obyczaje i wychowującym w duchu przywiązania do najważniejszych cnót ludzkich i obywatelskich.

Po ukończeniu gimnazjum w Rybniku i zdaniu matury w 1949 roku dostał się na Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dyplom lekarza otrzymał w 1954 roku i swoją lekarską i naukową karierę rozpoczął w Katedrze Medycyny Sądowej zostając asystentem profesora Jana Olbrychta. Pracował tam do 1962 roku, równocześnie praktykując jako lekarz w przychodni zdrowia.



Następnie zatrudniwszy się w Pracowni Neuropatologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, poświęcił się neuropatologii pod kierunkiem prof. Adama Kunickiego, który był również promotorem jego pracy doktorskiej zatytułowanej: „Dynamika zmian morfologicznych w mózgu pod wpływem działania urazu mechanicznego”. Pracownia Neuropatologii zmieniała nazwy i przynależność, zawsze jednak była to ta sama pracownia przy ulicy Botanicznej 3.

W latach 1968–1975 Pracownia należała do Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Następnie szefując Pracowni, a potem Zakładowi Neuropatologii powrócił do Akademii Medycznej, gdy Zakład Neuropatologii wszedł w skład nowoutworzonego Instytutu Neurologii. W tym czasie ukończył pracę habilitacyjną, której tematem był: „Doświadczalny obrzęk mózgu – badania porównawcze martwicy kriogennej i rany mózgowej” (opiekunem pracy habilitacyjnej był profesor Józef Hano). W roku 1981 otrzymał tytuł profesora nadzwyczajnego w dziedzinie neuropatologii.

Po przejściu na emeryturę w roku 1999, kontynuował dalej pracę jako profesor emerytowany, na pół etatu aż do ostatnich dni życia.

Profesor Józef Kałuża był autorem ponad 110 prac publikowanych w polskich i zagranicznych periodykach oraz autorem i współautorem wielu rozdziałów w podręcznikach. Jego pierwszym istotnym obszarem zainteresowania naukowego był uraz mózgu. Później dużą uwagę zwrócił na badania w dziedzinie histochemii. Było to m.in. związane z pobytem w NIH w Bethesda, w USA, jako stypendysty Fundacji Rockefellera w latach 1962–1963.

Profesor Kałuża stał się ogólnie znanym naukowcem w dziedzinie neuroonkologii nie tylko w Polsce. Jego ogromne diagnostyczne doświadczenie w dziedzinie guzów mózgu i rdzenia oraz innych schorzeń układu nerwowego sprawiło, że wiele ośrodków neurochirurgicznych i neurologicznych poza Krakowem, takich jak: w Jastrzębiu Zdroju, Rzeszowie, Tarnowie czy Kielcach, korzystało z jego konsultacji. Od czasu powstania Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu profesor Kałuża był zaangażowany tam w prace Zakładu Patomorfologii wykonując badania neuropatologiczne, oceniając materiał neurochirurgiczny oraz cytologię płynu mózgowo-rdzeniowego. Efektem bliskiej współpracy z Oddziałem Neurologii, później Kliniką Neurologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii, a w szczególności z Kliniką Neurologii Wieku Rozwojowego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach były liczne publikacje z dziedziny neurologicznych schorzeń pediatrycznych, takich jak leukodystrofie oraz na temat encefalopatii wieku dziecięcego.

Długotrwałe i głębokie więzy, nie tylko na gruncie czysto zawodowym, ale poprzez liczne trwałe przyjaźnie, łączyły profesora Kałużę z neuropatologami i przedstawicielami pokrewnych dziedzin naukowych z całej Polski a szczególnie z wieloma przedstawicielami tych dyscyplin z Warszawy, w tym z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, z jego byłym dyrektorem – profesorem Mirosławem Mossakowskim. Profesor Kałuża był członkiem Komitetu Nauk Neurologicznych PAN i przewodniczącym Komisji Neuroonkologii od 1973 roku aż do chwili śmierci.

Profesor Kałuża był współzałożycielem Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich i do końca swego życia jednym z najbardziej gorliwych i aktywnych jego członków. W

latach 1987–1991 pełnił funkcję prezesa Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, które to nadało mu również tytuł Członka Honorowego. Profesor traktował Stowarzyszenie niemal jak swego rodzaju “poszerzoną rodzinę”, troszcząc się o jego prestiż i dzieląc się z członkami Stowarzyszenia swymi doświadczeniami oraz naukowymi fascynacjami i problemami, będąc zawsze chętnym do pomocy i współpracy. Zawsze podkreślał konieczność ścisłych związków neuropatologii z kliniczną neurologią i neurochirurgią.

Profesor Kałuża, zwłaszcza w latach osiemdziesiątych był promotorem ożywionych kontaktów naukowych między neuropatologami z Polski i z Niemiec, a także innych krajów. Był m.in. organizatorem Polsko-Niemieckiej Konferencji Naukowej Neuropatologów w Krakowie w roku 1980.

Profesor Kałuża, który przeszedł gruntowne szkolenie w dziedzinie patomorfologii pod kierunkiem profesor Janiny Kowalczykowej, która do lat sześćdziesiątych XX wieku pełniła funkcję Kierownika Katedry Patomorfologii w Krakowie, zawsze utrzymywał ścisłe związki z Katedrą, a później Instytutem Patologii w Krakowie. Był m.in. aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Patologów, a szczególnie Krakowskiego Oddziału Towarzystwa, był zastępcą redaktora naczelnego “Patologii Polskiej” (obecnie; “*Polish Journal of Pathology*”) w latach 1991–1998, i prowadził wykłady z zakresu neuropatologii dla studentów III i IV roku w ramach zajęć z patomorfologii. Szczególnie wdzięczny Mu jestem za częste wsparcie w trudnych momentach, przyjaźń i stałą gotowość do konsultowania materiału neuropatologicznego. Profesor Kałuża był człowiekiem pełnym dobroci, a równocześnie nie popadł w tak częsty teraz relatywizm i umiał zło nazwać złem. Niezwykle sobie cenił pobyt w Castel Gandolfo, choć nigdy się tym nie chwalił.

Lata 1980–1981 – “lata Solidarności” – silnie pobudziły aktywność społeczną profesora. Został wybrany na prodziekana ds. nauki Wydziału Lekarskiego AM w Krakowie, a w następnych dwóch kolejnych kadencjach (1984–1990) pełnił funkcję dziekana Wydziału Lekarskiego. Został również wybrany na członka i przedstawiciela Akademii Medycznej w Krakowie w Radzie Głównej Szkolnictwa Wyższego i Nauki przy Ministrze Szkolnictwa Wyższego i Nauki na lata 1982–1985. Z tego okresu działalności zawsze z dużą przyjaźnią wypowiadał się o profesorze Ciesielskim (przewodniczącym Rady).

Od 1976 roku aż do swej śmierci profesor Kałuża pełnił, z nadania Rady Wydziału, funkcję Kuratora Funduszu Samopomocy Profesorów i Docentów Wydziału Lekarskiego, wspomagającego m.in. wdowy po zmarłych członkach Rady Wydziału.

W latach dziewięćdziesiątych profesor Kałuża znalazł jeszcze inne dwa obszary aktywności: była to neurobiologia – przedmiot nowo wprowadzony do programu studiów na Wydziale Lekarskim oraz etyka lekarska. Z początku była to nowość na Wydziale Lekarskim UJ, jednak kolejne lata przyniosły ogromny wzrost zainteresowania tą dyscypliną oraz jej znaczenia na całym świecie z uwagi na rosnącą wagę takich problemów, jak: eutanazja, inżynieria genetyczna, życie i cierpienie w terminalnej fazie choroby, nie mówiąc już o wcześniej znanych problemach związanych z aborcją czy przeszczepami narządów (do których doszły zagadnienia przeszczepów organów i komórek macierzystych etc.). Te i podobne zagadnienia stały się przedmiotem wykładów

profesora Kałuży z dziedziny etyki lekarskiej. Do nauczania etyki lekarskiej nadawał się jak nikt inny. Była w nim pełna spójność poglądów i wyznawanych wartości z całą drogą życiową, prawością postępowania, czy wychowaniem synów (z których, jak i z wnuków był bardzo dumny).

Trudno wymienić liczne członkostwa w różnych towarzystwach i stowarzyszeniach, członkostwa w radach naukowych, różne funkcje pełnione przez profesora Kałużę, wyliczyć dyplomy honorowe i nagrody, które otrzymał. Od 1999 roku profesor był członkiem-korespondentem Polskiej Akademii Umiejętności – bardzo sobie ten zaszczyt cenił.

Profesor był aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, m.in. w latach 1976–1992 pełnił funkcję naczelnego redaktora „Folia Histochemica et Cytobiologica”. Był też aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, Towarzystwa Lekarskiego Krakowskiego i Stowarzyszenia Lekarzy Katolickich. Profesor Kałuża został udekorowany Orderem „Polonia Restituta” oraz „Medalem Komisji Edukacji Narodowej”.

Pozostawił rodzinę, rzeszę przyjaciół i kolegów, współpracowników oraz uczniów, którym już zawsze będzie brakowało jego opieki, wiedzy, głębokiej filozofii życiowej, dobrych rad, trafnych spostrzeżeń, charakterystycznego humoru lub po prostu zwykłej obecności.

Jerzy Stachura
Dyrektor Katedry Patomorfologii Collegium Medicum UJ

KINETYKA ORAZ REGULACJA UWALNIANIA Smac/DIABLO Z MITOCHONDRIÓW KOMÓREK NOWOTWOROWYCH POD WPLYWEM STYMULACJI APOPTOGENNEJ

KINETICS AND REGULATION OF Smac/DIABLO RELEASE
FROM MITOCHONDRIA OF CANCER CELLS EXPOSED
TO APOPTOGENIC STIMULUS

Tomasz MOTYL¹*, Barbara GAJKOWSKA², Magdalena GÓRKA¹,
Michał Marek GODLEWSKI¹, Monika LAMPARSKA-PRZYBYSZ¹

¹ Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW

² Pracownia Ultrastruktury Komórki, Instytut Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Streszczenie: Większość stosowanych obecnie leków przeciwnowotworowych oraz radioterapia indukuje apoptozę przez uszkodzenie DNA lub hamowanie kluczowych enzymów w systemie przekazywania sygnału przeżycia komórki. Wyzwała to kaskadę reakcji prowadzących do aktywacji białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2, takich jak: Bad, Bid, Bax czy Bak, tworzących specyficzne kanały lub współtworzących megakanaly (mPTP) w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, pozwalające na uwalnianie z przestrzeni międzybłonowej białek apoptogennych, takich jak: cytochrom *c*, Smac/DIABLO, AIF, Omi/Htra2, prokaspaza 9 i 3 oraz endonukleaza G. Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*) jest drugim po cytochromie *c* aktywatorem kaspaz pochodzenia mitochondrialnego, którego funkcja polega na uwalnianiu kaspaz spod hamującego wpływu IAPs (*inhibitors of apoptotic proteases*). Prekursor Smac/DIABLO syntetyzowany jest jako 239-aminokwasowe białko, które po dotarciu do mitochondrium traci N-końcową sekwencję liderową, stając się dojrzałym białkiem o masie 21 kDa, mającym aktywność apoptotyczną. Odkryto, że Smac/DIABLO występuje w komórce w dwóch formach: krótkiej, nieaktywnej, cytoplazmatycznej (Smac/DIABLO-S) oraz długiej, aktywnej, mitochondrialnej (Smac/DIABLO-L). Ponieważ różnice między obydwoimi formami białka występują tylko na N-końcu, najprawdopodobniej N-końiec Smac/DIABLO-L decyduje o jego aktywności biologicznej. Hamujące działanie Smac/DIABLO na IAPs polega na kompetycyjnym blokowaniu domeny BIR3, co uniemożliwia przyłączenie kaspazy 9, oraz na zmianie struktury przestrzennej linkera BIR2, co z kolei uniemożliwia wiązanie kaspazy 3 i 7 przez IAPs. Smac/DIABLO uwalniany jest z mitochondriów nie tylko w apoptozie przebiegającej ścieżką mitochondrialną, lecz również receptorową. Wynika to z faktu, że sygnał apoptogenny z receptorów śmierci, przekazywany za pośrednictwem kaspazy 8 jest zbyt słaby dla pełnej aktywacji kaspaz wyko-

nawczych (3, 6 i 7) w komórkach nowotworowych. Receptorowy sygnał apoptogenny musi więc być amplifikowany przez uwolnienie Smac/DIABLO z mitochondriów i zniesienie hamującego wpływu IAPs na kaspazy. Ciekawe, że w tym przypadku najczęściej nie dochodzi do uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów, co może wskazywać na różny molekularny mechanizm uwalniania obydwu białek. Ostatnie własne badania z zastosowaniem homeostatycznej mikroskopii konfokalnej, pozwalającej na precyzyjne badanie kinetyki Smac/DIABLO w stymulowanej do apoptozy komórce nowotworowej, wykazały uwalnianie Smac/DIABLO-GFP z mitochondriów natychmiast po zastosowaniu leku cytotoksycznego. Zablockowanie aktywności m-kalpainy – aktywatora Bax opóźniło uwalnianie Smac/DIABLO-GFP z mitochondriów i hamowało apoptozę. Kolejne własne badania z zastosowaniem laserowej cytometrii skaningowej, mikroskopii konfokalnej i immunoelektronowej oraz dane literaturowe wskazują jednoznacznie na kluczową rolę Bax i prawdopodobnie innych białek współtworzących megakanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej w regulacji uwalniania Smac/DIABLO z mitochondrium.

Słowa kluczowe: apoptoza, Smac/DIABLO, Bax, Bid, Bcl-2, cytochrom *c*, kaspazy, mitochondria, komórki nowotworowe, leki przeciwnowotworowe, laserowa cytometria skaningowa, homeostatyczna mikroskopia konfokalna, mikroskopia immunoelektronowa.

Summary: The majority of currently applied anticancer drugs and radiotherapy activate mitochondrial pathway of apoptosis through DNA damage and inhibition of key enzymes involved in the survival signaling pathways of cancer cells. That triggers the cascade of reactions leading to the activation of proapoptotic proteins from Bcl-2 family such as: Bad, Bid, Bax and Bak, which are involved in formation of specific channels or coformation of megachannels (mPTP) in outer mitochondrial membrane. These channels are responsible for the release of apoptogenic proteins such as cytochrome *c*, Smac/DIABLO, AIF, Omi/HtrA2, procaspase-9 and -3 and endonuclease G from mitochondrial intermembrane space. Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*) is second (after cytochrome *c*) activator of caspases, functioning through the release of caspases from inhibitory effects of IAPs (*inhibitors of apoptotic proteases*). Precursor of Smac/DIABLO is synthesized as a 239-amino acid protein. After reaching mitochondria the Smac/DIABLO precursor loses the N-terminal mitochondrial-targeting sequence and becomes the mature 21 kDa protein with apoptotic activity. It was shown, that Smac/DIABLO exists in two forms in the cell: inactive cytosolic short form (Smac/DIABLO-S) and active mitochondrial long form (Smac/DIABLO-L). Because differences between both forms occur only at N-terminus, probably the N-terminal residues of Smac/DIABLO are responsible for its biological activity. Inhibitory function of Smac/DIABLO on IAPs depends on competitive blocking of BIR3 domain, which inhibits binding of caspase-9. Apart from this, changes occur at spatial structure of BIR2 linker, thus inhibiting IAPs interaction with caspase-3 and -7. Smac/DIABLO is released from mitochondria not only in mitochondrial, but also in death receptor pathways of apoptosis. It results from the fact, that apoptotic signal derived from death receptors through caspase-8 is too weak for the complete activation of executory caspases (-3, -6 and -7) in cancer cells. The death receptor signal must be amplified through the release of Smac/DIABLO from mitochondria and removal of inhibitory influence of IAPs on caspases. It is interesting, that during this event cytochrome *c* is not released from mitochondria, which may indicate a different molecular mechanism of release of both proteins. In our recent study homeostatic confocal microscopy was used for precise evaluation of Smac/DIABLO kinetics in cancer cells stimulated to apoptosis. These studies revealed the release of Smac/DIABLO-GFP from mitochondria beginning immediately after cancer cell exposure to cytotoxic drug. Inhibition of m-calpain (regarded as a Bax activator) delayed the escape of Smac/DIABLO-GFP from mitochondria and inhibited apoptosis. Our data based on laser scanning cytometry, confocal microscopy and immunoelectron microscopy as well as literature data indicate the key role of Bax and other proteins implicated in formation of megachannels in outer mitochondrial membrane in the regulation of Smac/DIABLO release from mitochondrial intermembrane space.

Key words: apoptosis, anticancer drugs, cytochrome *c*, Smac/DIABLO, Bad, Bid, Bax and Bak mitochondria, caspases, cancer cells, laser scanning cytometry, confocal microscopy and immunoelectron microscopy.

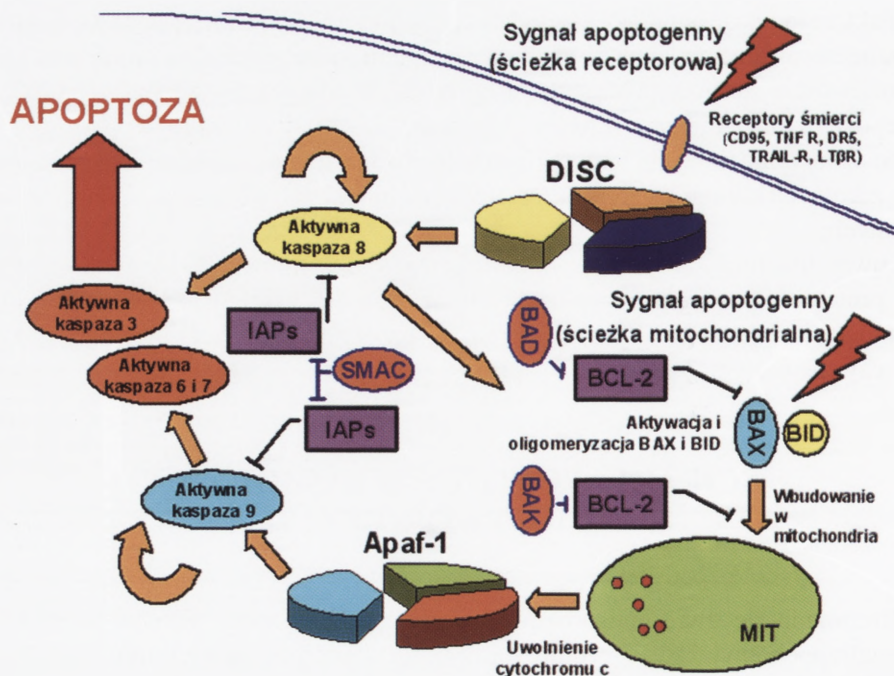
Fakt, że indukcja apoptozy jest podstawą chemio- i radioterapii nowotworów, sprawił, że zainteresowanie molekularnymi mechanizmami apoptozy komórek nowotworowych i możliwością sterowania nią stało się ogromne. Wykorzystanie zdobyczy naukowych w tej dziedzinie zmierza w trzech kierunkach:

- 1) poszukiwania nowych, bardziej specyficznych, a jednocześnie nietoksycznych dla zdrowych komórek leków przeciwnowotworowych o właściwościach apoptogennych;
- 2) „uwrażliwiania” na apoptozę komórek rakowych z mutacjami kluczowych genów proapoptotycznych i supresorowych, np. Bax, Smac/DIABLO czy p53;
- 3) integracji obydwu powyższych kierunków przez połączenie terapii genowej z radio- czy chemioterapią.

ŚCIEŻKI APOPTOZY W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Rozróżnia się dwie podstawowe ścieżki apoptozy komórek nowotworowych: zewnątrzpochodną, tzw. receptorową oraz wewnątrzpochodną – mitochondrialną, aczkolwiek ostatnio dużą uwagę zwraca się na wzajemne powiązania pomiędzy nimi, szczególnie dotyczące regulacji funkcji mitochondriów w procesie apoptozy (ryc. 1).

Głównym łącznikiem obydwu ścieżek wydaje się być kaspaza 8, która w ścieżce receptorowej zaangażowana jest w aktywację tzw. kaspaz wykonawczych: kaspazy 3, 6 i 7, natomiast w ścieżce mitochondrialnej aktywuje Bid, który oligomeryzując z Bax współtworzy megakanaly w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, umożliwiając uwalnianie z przestrzeni międzybłonowej czynników apoptogennych, takich jak: cytochrom *c*, AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, prokaspaza 9 [27, 41] i 3 oraz endonukleaza G. W odniesieniu do ścieżki receptorowej apoptozy najbardziej znane są: receptory śmierci, należące do rodziny receptorów TNF (*tumor necrosis factor*): np. TNF receptor-1, CD95 (APO-1/Fas), dwa receptory dla TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) oraz ostatnio opisany receptor limfotoksyny β [28]. W przeciwieństwie do TNF α i liganda CD95, których toksyczność jest bardzo duża dla normalnych komórek, TRAIL przekazuje sygnał do śmierci przede wszystkim komórkom stransformowanym nowotworowo, przez co może być obiecującym związkiem używanym w terapii przeciwrakowej. Przemawia za tym również fakt, że wejście na ścieżkę receptorową apoptozy poprzez receptor śmierci pomija wiele form oporności na apoptozę komórek nowotworowych, wynikających z ich mutacji, np. braku funkcjonalnego „strażnika genomu” p53 lub też z antyapoptotycznego wpływu nadekspresji Bcl-2 często charakteryzującej komórki nowotworowe. Wykazano również, że TRAIL receptor-2 jest jednym z genów docelowych p53 [42]. Sugeruje się też synergistyczne działanie TRAIL z napromienianiem oraz lekami uruchamiającymi ścieżkę mitochondrialną uśmiercania komórek nowotworowych [46].



RYCINA 1. Ścieżki apoptozy: receptorowa i mitochondrialna [13]

Indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych zachodzi nie tylko przez pobudzenie receptorów śmierci, lecz także przez blokowanie receptorów i ścieżek sygnałowych dla czynników warunkujących przeżywalność i wzrost komórek nowotworowych, np. EGF, TGF α czy IGF-I. Wykazano ostatnio synergistyczne oddziaływanie Herceptyny oraz Iressy (ZD1839) w uśmiercaniu komórek raka piersi, które polegało na równoczesnym blokowaniu odpowiednio receptora: c-erb-B2/HER2 i receptora EGF [34]. Stwierdzono również, że nadekspresja fosfatazy tyrozynowej prowadzi do apoptozy komórek raka piersi [3]. Wszystkie powyższe czynniki indukują apoptozę przez zablokowanie „ścieżek przeżycia” na różnym ich poziomie. Prowadzi to ostatecznie do obniżenia aktywności kinaz: ERK1/2 i PKB i w konsekwencji do defosforylacji Bad. Bad jest białkiem proapoptotycznym z rodziny Bcl-2, które w postaci ufosforylowanej jest białkiem nieaktywnym. W tym też stanie utrzymywane jest w komórkach nowotworowych przez wysoką aktywność ERK1/2 i PKB. Nie wiadomo dotychczas, w jaki sposób w wyniku defosforylacji Bad dochodzi do aktywacji Bax i uruchomienia mitochondrialnej ścieżki apoptozy. Sugeruje się, że aktywny Bad może wypierać Bax z heterodimerów z Bcl-2, jednakże hipoteza ta wymaga weryfikacji [24].

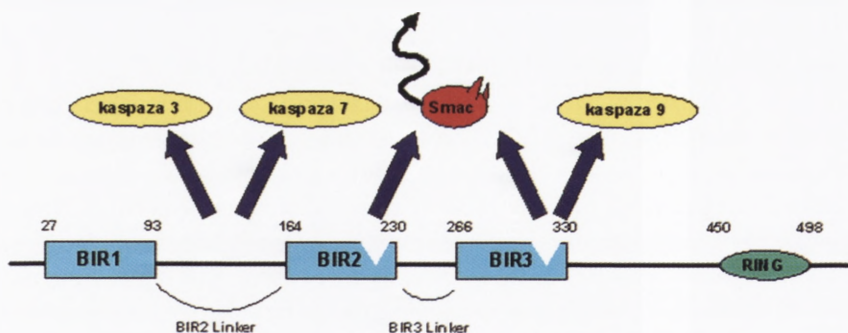
Większość stosowanych obecnie leków przeciwnowotworowych oraz napromienianie indukuje apoptozę przebiegającą ścieżką mitochondrialną przez uszkodzenie DNA lub hamowanie kluczowych enzymów w systemie przekazywania sygnału przeżycia komórki. Wyzwala to kaskadę reakcji prowadzących do aktywacji białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2, takich jak Bad, Bid, Bax czy Bak, tworzących specyficzne kanały lub współtworzących z innymi białkami (np. VDAC-1, ANT) megakanały (*mitochondrial permeability transition pores* – mPTPs) w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, pozwalające na uwalnianie z przestrzeni międzybłonowej wymienionych wcześniej czynników apoptogennych. Aktywacja Bid przebiega przez proteolityczne rozszczepienie przy udziale kaspazy 8, przy czym proces ten może być amplifikowany przez kaspazę 3 i hamowany przez fosforylację Bid [7]. Z kolei Bax jest aktywowany przez proteolityczne rozszczepienie przy udziale m-kalpainy [12]. Własne obserwacje wykazały, że zastosowanie inhibitora m-kalpainy zapobiega wewnątrzkomórkowej translokacji i agregacji Bax w stymulowanych do apoptozy komórkach ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy COLO 205 [16]. Wykazaliśmy również, że bez względu na molekularny mechanizm indukcji apoptozy przez różne leki przeciwnowotworowe, Bax jest zawsze centralnym ogniwem w ścieżce mitochondrialnej [15]. Aktywny Bax przemieszcza się do błon organelli, w tym mitochondrialnych, gdzie w postaci heteromultimerycznych kompleksów z Bid i VDAC-1 (*voltage-dependent anion channel-1*) współtworzy megakanały (mPTPs) w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Megakanał błonowy zbudowany z tych białek jest prawdopodobnie drogą uwalniania cytochromu *c* i być może innych mediatorów apoptozy z przedziałów w przestrzeni międzybłonowej. Poza otwarciem megakanału wyróżnia się jeszcze inne mechanizmy uwalniania przez Bax proapoptogennych czynników z międzybłonowej przestrzeni mitochondrialnej, np. tworzenie specyficznych kanałów przez białko Bax oraz destabilizację przez Bax błony mitochondrialnej i tworzenie „dziur lipidowych” [43]. Stwierdzono, że aktywne białko Bid jest niezbędne dla oligomeryzacji Bax [38] lub może tworzyć 45 kDa homotrimer wbudowujący się w zewnętrzną błonę mitochondrialną i uwalniający mitochondrialne mediatory apoptozy [18]. Dotychczas nie wiadomo, na ile inne (poza Bid) wewnątrzkomórkowe ligandy śmierci, takie jak: Bim czy Hrk, współdziałają z Bax w tworzeniu kanałów błonowych i uwalnianiu czynników apoptogennych z mitochondriów. Ostatnie badania sugerują interakcje Bim i Hrk z Bax w komórkach stymulowanych do apoptozy [37]. Uwolniony cytochrom *c* wraz z cytozolowym Apaf-1, dATP i prokaspazą 9 tworzy kompleks zwany apoptosomem, w którym dochodzi do powstania aktywnej kaspazy 9. Kaspaza ta z kolei aktywuje kaspazy wykonawcze, tj. kaspazę 3, 6 i 7. Ostatnie obserwacje wskazują, że aktywne kaspazy 9 i 3 przedostają się z cytozolu do mitochondriów, gdzie na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego aktywują mitochondrialne prokaspazy 9 i 3, uczestnicząc w dezintegracji funkcji mitochondriów [5]. Z uwagi na swoje zadania cytochrom *c* uważany jest za pierwszego aktywatora kaspaz pochodzenia mitochondrialnego.

Smac/DIABLO – MECHANIZM DZIAŁANIA

Za drugiego aktywatora kaspaz pochodzenia mitochondrialnego uważany jest Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*), znany także pod nazwą DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*). Smac/DIABLO aktywuje kaspazy przez uwalnianie ich spod hamującego wpływu IAPs (*inhibitors of apoptotic proteases*) [9, 4, 40, 21]. Z drugiej strony, IAPs stymulują ubikwitynację Smac/DIABLO zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* prowadząc do jego degradacji [20].

Smac/DIABLO zostało zidentyfikowane w 2000 roku przez dwa niezależne zespoły naukowców [9, 44] jako białko proapoptotyczne, umożliwiające aktywację kaspaz. Wykorzystując zdolność białkowych frakcji błonowych do zwiększania aktywacji kaspazy 3 udało się oczyścić z komórek HeLa 25 kDa białko, które następnie częściowo zsekwencjonowano. Na podstawie zdobytych w ten sposób informacji, sklonowano to białko z biblioteki cDNA utworzonej z komórek HeLa. Przewidywano, że wpływ białka Smac/DIABLO na aktywację kaspazy 3 może odbywać się na dwa różne sposoby. Jednym z nich było jego bezpośrednie działanie na kompleks cytochrom c/ Apaf-1/prokaspaza 9, drugim działanie pośrednie przez wywieranie wpływu na inhibitory apoptozy. Stworzono białko rekombinowane Smac/DIABLO z etykietką histydynową i unieruchomione na złożu niklowym białko inkubowano z ekstraktem komórkowym. Po odizolowaniu złoża ekstrakt testowano na aktywację kaspazy 3 i zaobserwowano znaczny wzrost jej aktywności. Metodą *Western-Blot* wykryto, iż w złożu pozostały oprócz białka Smac/DIABLO białka z rodziny IAP (cIAP-1, cIAP-2, XIAP) i białko surwiwina [9]. Drugi zespół naukowców stransfekował komórki linii 293T wektorem kodującym białko XIAP. Przy pomocy koimmunoprecypitacji oczyszczono białko wiążące się do wprowadzonego białka. Uzyskanie częściowej sekwencji aminokwasowej tego białka umożliwiło całkowite jego sklonowanie [44].

Smac/DIABLO jest białkiem mitochondrialnym, ale podczas apoptozy jest uwalnianie do cytoplazmy. Prekursor Smac/DIABLO syntetyzowany jest jako 239-aminokwasowe białko i ma tzw. sekwencję liderową (MTS – *mitochondrial targeting sequence*) na N-końcu (55 reszt aminokwasowych), która odcinana jest po dotarciu do mitochondrium. Wówczas białko uzyskuje dojrzałą formę o masie molekularnej 21 kDa, mającą aktywność apoptotyczną. MTS kodowany jest przez dwa pierwsze eksony. Odkryto, że Smac/DIABLO występuje w komórce w dwóch formach, w formie krótkiej (Smac/DIABLO-S) i w formie długiej (Smac/DIABLO-L). Forma krótka występuje we wszystkich badanych liniach komórkowych, ale jest jej mniej niż formy długiej, ponadto wykryto ją tylko w cytoplazmie. Porównanie aktywności Smac/DIABLO-S i Smac/DIABLO-L (po odcięciu sekwencji liderowej) wykazało, że dojrzałe Smac/DIABLO-L zdolne było do zmniejszenia efektu hamującego białka XIAP (i aktywacji kaspaz 7, 9 oraz 3) w sposób zależny od dawki. Białko Smac/DIABLO-S było prawie nieaktywne w tym oznaczeniu [39]. Ponieważ różnice między dwoma formami białka występują tylko na N-końcu (Smac/DIABLO-L: AVPIA; Smac/DIABLO-S: MKSDFYF), najprawdopodobniej N-koniec Smac/DIABLO-L decyduje o jego aktywności biologicznej.



RYCINA 2. Schemat działania białka Smac/DIABLO na IAPs. Białko Smac/DIABLO kompetycyjnie blokuje domenę BIR3 uniemożliwiając przyłączenie kaspazy 9 oraz zmienia strukturę przestrzenną linkera BIR2 uniemożliwiając wiązanie kaspaz 3 i 7

Stwierdzono funkcjonowanie białka Smac/DIABLO zarówno na poziomie apoptosomu, jak i kaspaz efektorowych. Schemat działania Smac/DIABLO na IAPs przedstawiono na rycinie 2. N-koniec białka Smac/DIABLO jest niezbędny do oddziaływania z domeną BIR3 białka XIAP i wspomaganie aktywacji kaspaz zależnej od cytochromu *c*. Białka IAP mają na C-końcu tzw. strukturę typu palca cynkowego (*RING finger*), a na N-końcu zmienną ilość specyficznych domen, tzw. domen BIR (*baculovirus IAP repeats*). Domeny BIR biorą udział w oddziaływaniach białek IAP z innymi białkami, a ich obecność jest niezbędna dla spełniania hamujących funkcji. Białko XIAP zmniejsza lub blokuje apoptozę przez domeny BIR3 i BIR2, które hamują aktywność odpowiednio kaspazy 9 i 3. XIAP wiąże się do kompleksu aktywna kaspaza 9/Apaf-1 przez N-koniec peptydu w małej podjednostce kaspazy 9, który zostaje odsłonięty po proteolitycznym cięciu prokaspazy 9. Delecja peptydu kaspazy 9 zapobiega jej wiązaniu z białkiem XIAP i hamowaniu aktywności. Udowodniono, że N-koniec małej podjednostki kaspazy 9 zawiera 4 aminokwasy, które wykazują homologię do peptydu w dojrzałym białku Smac/DIABLO i w proapoptotycznych białkach *Drosophila*: Hid, Grim i Reaper. Dowodzi to ewolucyjnie bardzo konserwatywnej struktury i mechanizmów aktywacji apoptozy przez Smac/DIABLO. Cztery pierwsze reszty aminokwasowe na N-końcu Smac/DIABLO (Ala-Val-Pro-Ile) rozpoznają wgłębienie na powierzchni domeny BIR3, mającej pierwszą resztę aminokwasową Ala, tworząc cztery wiązania wodorowe [29, 47]. Smac/DIABLO wzmaga aktywność kaspazy 9 przez rozrywanie wiązania między kaspazą a domeną BIR3 [40]. Proces ten zależny jest od dynamiki i stechiometrii białek XIAP i Smac/DIABLO. Stwierdzono, że Smac/DIABLO wzmaga aktywację prokaspazy 3 *in vitro*, ale też enzymatyczną aktywność dojrzałej kaspazy 3 w sposób zależny od zastosowanej dawki. Do hamowania aktywności kaspazy 3 przyczynia się tylko domena BIR2 z białka XIAP, natomiast domeny BIR1 i BIR3 nie działają hamująco. Nadekspresja Smac/DIABLO lub traktowanie 7- lub 4-aminokwasowym peptydem z N-końca Smac/

DIABLO zwiększa aktywność kaspazy 3. Nasilenie apoptozy w tych warunkach związane jest z hamowaniem XIAP, cIAP1 i surwiwiny [19].

Struktura krystaliczna Smac/DIABLO wskazuje, że białko to homodimeryzuje przez hydrofobową powierzchnię. Mutacje typu *missens*, w kluczowych resztach hydrofobowych odpowiedzialnych za dimeryzację, inaktywują te miejsca. Mutanty niezdolne do dimeryzacji tracą też zdolność do wiązania się z domeną BIR2. Natomiast zarówno otrzymane mutanty dimeryzujące i mutanty, które straciły tę zdolność, wciąż mogą wiązać się z domeną BIR3. Podczas apoptozy białko XIAP jest cięte na dwa fragmenty. Porównywano serię białek fuzyjnych zawierających różne fragmenty białka XIAP połączone z GST i sprawdzano ich oddziaływanie z białkiem Smac/DIABLO [4]. Pozytywne interakcje zaobserwowano tylko z białkami mającymi domeny BIR2 lub BIR3. Białko fuzyjne zawierające tylko domenę BIR1 nie reagowało z białkiem Smac/DIABLO. Odkryto też, że Smac/DIABLO nie może jednocześnie łączyć się z dwoma domenami (BIR2 i BIR3) [4].

Zaobserwowano, że myszy niewykazujące ekspresji białka Smac/DIABLO były zdrowe, dojrzewały normalnie i nie wykazywały żadnych nienormalności histologicznych. Pomimo że cięcie prokaspazy 3 *in vitro* było hamowane w lizatach komórek niemających białka Smac/DIABLO, wszystkie testowane typy komórek odpowiadały normalnie na stymulację apoptotyczną. Dane te sugerują, że istnieje jakieś inne białko/białka kompensujące brak działania Smac/DIABLO [35]. Takim kandydatem jest Omi/HtrA2 – proteaza serynowa, będąca drugim białkiem u ssaków, które ma motyw Reaper i wiąże XIAP. Omi/HtrA2 o pełnej długości znajduje się w mitochondrium, ale nie jest zdolne do reakcji z XIAP. W mitochondrium znajduje się również przetworzone Omi/HtrA2, które pod wpływem stymulacji apoptotycznej uwalniane jest do cytoplazmy i reaguje z XIAP, c-IAP, OplAP, lecz nie z surwiwiną [45]. Wykazano, że nadekspresja Omi/HtrA2 uczuła komórki na apoptozę [31].

Sterowanie ekspresją Smac/DIABLO może mieć duże implikacje praktyczne w terapii onkologicznej, gdyż wprowadzenie genu kodującego białko Smac/DIABLO bądź białka Smac/DIABLO uwrażliwia różne komórki nowotworowe *in vitro* oraz komórki glejaka złośliwego *in vivo* na apoptozę indukowaną ligandami receptorów śmierci lub lekami cytotoksycznymi. Ekspresja aktywnej cytoplazmatycznie formy Smac/DIABLO oraz białko Smac/DIABLO zdolne przeniknąć do komórki omijają blokadę uwalniania Smac/DIABLO z mitochondrium wytworzoną przez Bcl-2 [11].

Wykazano, że pierwsze nukleotydy z N-końca (od 4 do 8) Smac/DIABLO, połączone fuzją z sekwencją nośnikową pochodzącą z *Drosophila*, nasilają apoptozę i antyproliferacyjne działanie różnych leków przeciwnowotworowych (paklitaksel, etopozyd, 7-etylo-10-hydroksykamptotecyna (SN-38), doxorubicyna) w komórkach raka piersi linii MCF-7. Smac/DIABLO w połączeniu z nośnikiem przenika przez błonę komórkową, wiąże XIAP i cIAP1 potęgując w konsekwencji działanie kaspaz efektorowych wywołane lekami [2].

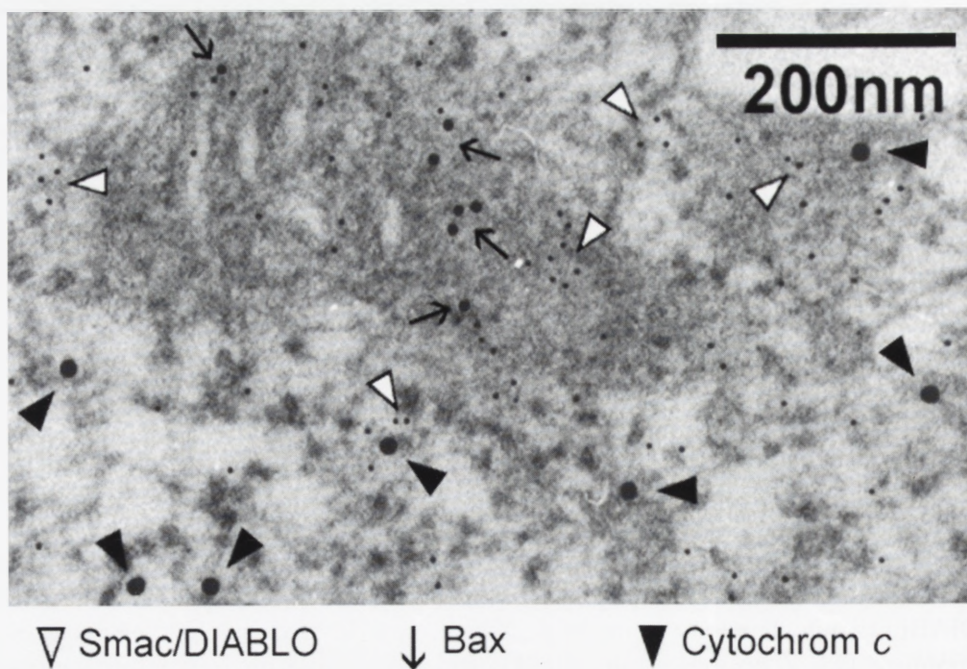
ROLA PROMOTORÓW APOPTOZY Z RODZINY BCL-2 W REGULACJI UWALNIANIA Smac/DIABLO Z MITOCHONDRIÓW KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Pomimo licznych badań, kinetyka i molekularny mechanizm uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów jest wciąż kontrowersyjny. Proponowane są przynajmniej trzy hipotezy dotyczące współzależności między uwalnianiem cytochromu *c* i Smac/DIABLO z mitochondriów:

- 1) obydwa białka uwalniane są z mitochondriów równocześnie [30],
- 2) uwalnianie Smac/DIABLO jest niezależne od wypływu cytochromu *c* [6] oraz
- 3) kinetyka uwalniania cytochromu *c* i Smac/DIABLO z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium jest zależna od rodzaju ścieżki apoptotycznej: receptorowej lub mitochondrialnej [1].

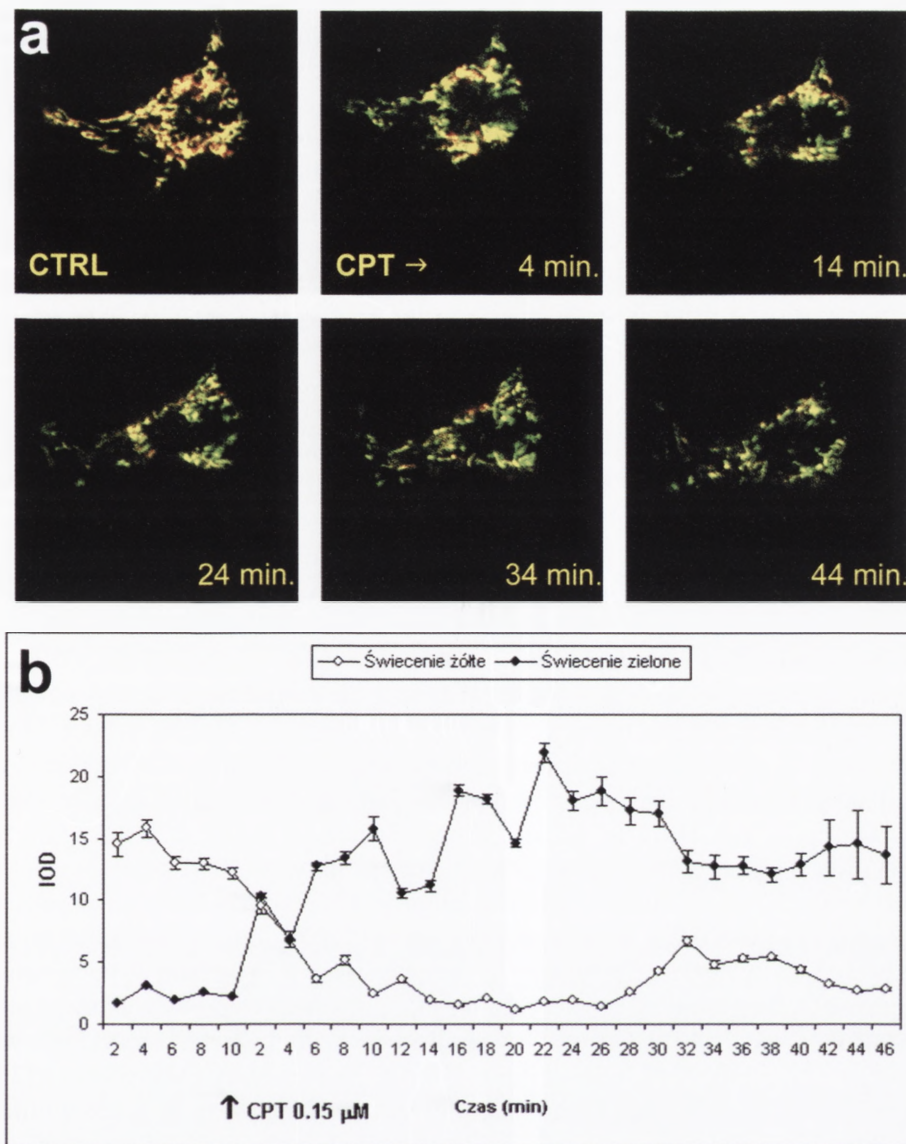
Dotychczasowe dane literaturowe oraz własne obserwacje [14, 25, 26, 33] wskazują, że białka pro- i antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2 odgrywają kluczową rolę w regulacji uwalniania czynników apoptogennych z mitochondriów. Stwierdzono, że nadekspresja Bcl-2 (najsilniejszego fizjologicznego inhibitora apoptozy) hamuje wypływ Smac/DIABLO z mitochondriów komórek poddawanych różnym czynnikom indukującym apoptozę [1]. Z drugiej strony, białko Bid permeabilizuje zewnętrzną błonę mitochondrialną, umożliwiając w ten sposób szybkie uwalnianie cytochromu *c* i Smac/DIABLO ze wszystkich przedziałów przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, a także prowadząc do spadku mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$) [30]. Własne obserwacje wykazały jednak, że Bid jedynie współtworzy megakanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, razem z Bax oraz VDAC-1 [14, 25]. Ekspresja Bax jest niezbędna dla uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów, ponieważ *knock out* genu *bax* blokuje ten proces w mysich zarodkowych fibroblastach stymulowanych do apoptozy przez TRAIL [22]. Wykazano, że zależne od Bax uwalnianie Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 z mitochondriów odgrywa istotną rolę w aktywacji kaspazy 3 i apoptozie wzbudzonej przez tapsygarginę (inhibitor Ca^{2+} -ATP-azy) w komórkach ludzkiego raka okrężnicy linii HCT116 [48].

Ostatnie własne badania z zastosowaniem metody *triple staining immunogold* wykazały, że uwalnianie Smac/DIABLO i cytochromu *c* z mitochondriów komórki raka piersi linii MCF-7 stymulowanej do apoptozy lekiem cytotoksycznym – kamptotecyną związane jest z agregacją Bax na błonach mitochondrialnych (ryc. 3). Co więcej Smac/DIABLO i cytochrom *c* uwalniane były z mitochondriów równocześnie, co jest prawdopodobnie domeną mitochondrialnej ścieżki apoptozy aktywowanej przez leki cytotoksyczne. Aby zbadać bardziej precyzyjnie kinetykę uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów, zastosowaliśmy homeostatyczną mikroskopię konfokalną oraz model komórki raka piersi MCF-7 transfekowanej podwójnie: wektorem ekspresyjnym Smac/DIABLO-GFP oraz pDsRed2-Mito wektorem (ryc. 4). W komórce niestymulowanej do apoptozy zielona fluorescencja Smac/DIABLO-GFP nakłada się na czerwoną fluorescencję mitochondriów (wyznakowanych białkiem lokalizacji



RYCINA 3. Uwalnianie Smac/DIABLO i cytochromu *c* z mitochondrium raka piersi MCF-7 pod wpływem kamptotecyny (0,15 μ M). Obraz z mikroskopu elektronowego uzyskany metodą potrójnego znakowania z wykorzystaniem przeciwciał sprzężonych z koloidalnym złotem o różnej średnicy ziaren: Smac/DIABLO – 6 nm, Bax – 12 nm, cytochrom *c* – 18 nm

mitochondrialnej pDsRed2-Mito), co manifestuje się intensywną jasnożółtą fluorescencją na tle czerwonej. Uwalnianiu Smac/DIABLO-GFP z mitochondriów w czasie apoptozy towarzyszy zanik żółtej fluorescencji i pojawianie się zielonej fluorescencji poza mitochondrium (ryc. 4a). Termin homeostatyczna mikroskopia konfokalna został wprowadzony przez nas dla podkreślenia zachowania podstawowych warunków homeostazy w przeżyciowym badaniu komórek z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej [17]. Dzięki tej metodzie istnieje możliwość badania w przedziałach minutowych kinetyki białek sprzężonych z GFP lub RFP. Po przeniesieniu uzyskanych obrazów do *MicroImage System* przelicza się zmiany obszaru oraz intensywności żółtej i zielonej fluorescencji zachodzące w czasie obserwacji. Uzyskane wyniki wskazują, że już od pierwszych minut po dodaniu do środowiska komórki kamptotecyny występuje postępujący zanik żółtej fluorescencji (odpowiadający mitochondrialnemu Smac/DIABLO) i wzrost zielonej fluorescencji (odpowiadający cytoplazmatycznemu Smac/DIABLO) (ryc. 4b). Po kilkunastu minutach od podania kamptotecyny obserwuje się szczególnie nasilenie zielonej fluorescencji świadczące o gwałtownym wypływie Smac/DIABLO z mitochondriów. Na rolę Bax w regulacji uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów wskazuje fakt wyraźnego opóźnienia wypływu badanego białka z mitochondriów komórki, w której zablokowano aktywność m-kalpainy, uważanej za



RYCINA. 4. Dynamiczny obraz uwalniania Smac/DIABLO-GFP z mitochondrium komórki raka piersi MCF-7 pod wpływem kamptotecyny (0,15 μ M). Obraz uzyskany metodą homeostatycznej mikroskopii konfokalnej (a) poddano analizie stosując MicroImage System (Olympus Optical Co.) – (b). Komórka została podwójnie transfekowana wektorami: Smac/DIABLO-GFP i pDsRed2-Mito Vector. Przed podaniem kamptotecyny zielona fluorescencja Smac/DIABLO-GFP nakłada się na czerwoną fluorescencję białka lokalizacji mitochondrialnej dając jasnożółtą fluorescencję. W komórce traktowanej kamptotecyną obserwuje się zanik żółtej fluorescencji odpowiadającej mitochondrialnej lokalizacji Smac/DIABLO-GFP i wzrost intensywności zielonej fluorescencji odpowiadającej cytoplazmatycznej lokalizacji tego białka

aktywatora Bax [12]. Znaczenie Bax w regulacji uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów ludzkich komórek rakowych wykazano również w apoptozie wzbudzonej przez TRAIL [8] oraz tapsyngarginę [48]. Wydaje się, że zależne od Bax uwalnianie Smac/DIABLO bez równoczesnego wypływu cytochromu *c* z mitochondriów może zachodzić w ścieżce receptorowej apoptozy komórek nowotworowych [8]. W tym wypadku kaspaza 8 nie jest w stanie doprowadzić do pełnej aktywacji kaspaz wykonawczych, gdyż są one hamowane przez IAPs. Receptorowy sygnał apoptogenny musi być więc amplifikowany przez ścieżkę mitochondrialną, w przebiegu której zależne od Bax megakanaly umożliwiają uwalnianie Smac/DIABLO z mitochondriów i znoszenie przez ten czynnik hamującego wpływu IAPs na kaspazy. Ciekawe, że pojedynczy *knock out* Bid, Bax lub Bak zapobiega uwalnianiu Smac/DIABLO, lecz nie zapobiega uwalnianiu cytochromu *c* z mitochondriów i apoptozie [22]. Z drugiej strony, podwójny *knock out* Bax i Bak znosi wpływ cytochromu *c* do cytoplazmy, sugerując przez to, że zarówno Bax, jak i Bak są wymagane dla uwalniania tego czynnika z mitochondriów. Powyższe wyniki wskazują na istotne różnice w molekularnym mechanizmie uwalniania Smac/DIABLO i cytochromu *c* z mitochondriów. Nasuwa się pytanie: dlaczego aktywacja Bid i Bax w ścieżce mitochondrialnej prowadzi do wypływu zarówno cytochromu *c*, jak i Smac/DIABLO, natomiast w przypadku ścieżki receptorowej uwalniany jest w większości opisanych przypadków tylko Smac/DIABLO?

Odpowiedź na to pytanie nie jest znana. Można jedynie przypuszczać, że aktywowane przez kompleks Bax-Bid kanaly mogą być różne dla obydwu białek lub też są takie same, lecz otwierają się w różnych przedziałach przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, w których upakowane są osobno omawiane białka. Jest także prawdopodobne, że kanał aktywowany przez Bax-Bid w ścieżce mitochondrialnej wymaga zaangażowania jeszcze innego lub innych białek promotorowych apoptozy, np. Bak.

Duże znaczenie Smac/DIABLO jako mediatora apoptozy komórek nowotworowych, wzbudzonej zarówno przez ligandy śmierci, jak też leki cytotoksyczne sprawia, że zainteresowanie tym białkiem, regulacją jego uwalniania i możliwościami wykorzystania w terapii onkologicznej wciąż rośnie. Ostatnie prace wskazują na próby wykorzystania Smac/DIABLO i jego pochodnych jako czynników uwrażliwiających komórki rakowe na apoptogenne działanie ligandów śmierci [31, 10] oraz leków cytotoksycznych [23, 32]. Poza tym Smac/DIABLO jako wspólny mediator apoptozy w ścieżce mitochondrialnej i receptorowej komórek nowotworowych może być wykorzystywany jako wiarygodny wskaźnik apoptozy w testowaniu nowych leków onkologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADRAIN C, CREGAN EM, MARTIN SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* 2001; **20**(23): 6627–6636.
- [2] ARNT CR, CHIOREAN MV, HELDEBRANT MP, GORES GJ, KAUFMANN SH. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 *in situ*. *J Biol Chem* 2002; **277**(46): 442362–44243.

- [3] BOMPARD G, PUECH C, PREBOIS C, VIGNON F, FREISS G. Protein-tyrosine phosphatase PTPL1/FAP-1 triggers apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2002; **277**(49): 47861–47869.
- [4] CHAI J, DU C, WU JW, KYIN S, WANG X, SHI Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; **406**(6798): 855–862.
- [5] CHANDRA D, TANG DG. Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. Lack of evidence for Apaf-1-mediated procaspase-9 activation in the mitochondria. *J Biol Chem* 2003; **278**(19): 17408–17420.
- [6] CHAUHAN D, HIDESHIMA T, ROSEN S, REED JC, KHARBANDA S, ANDERSON KC. Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 2001; **276**(27): 24453–24456.
- [7] DEGLI ESPOSTI M, FERRY G, MASDEHORS P, BOUTIN JA, HICKMAN JA, DIVE C. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem* 2003; **278**(18): 15749–15757.
- [8] DENG Y, LIN Y, WU X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 2002; **16**(1): 33–45.
- [9] DU C, FANG M, LI Y, LI L, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; **102**(1): 33–42.
- [10] FEHLBERG S, GREGEL CM, GOKE A, GOKE R. Bisphenol A diglycidyl ether-induced apoptosis involves Bax/Bid-dependent mitochondrial release of apoptosis-inducing factor (AIF), cytochrome c and Smac/DIABLO. *Br J Pharmacol* 2003; **139**(3): 495–500.
- [11] FULDA S, WICK W, WELLER M, DEBATIN KM. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma *in vivo*. *Nat Med* 2002; **8**(8): 808–815.
- [12] GAO G, DOU QP. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 2000; **80**(1): 53–72.
- [13] GODLEWSKI MM. Subcellular redistribution of apoptosis-promoting proteins from Bcl-2 family as an early response of cancer cells apoptogenic drugs. Praca doktorska SGGW, Warszawa 2003.
- [14] GODLEWSKI MM, GAJKOWSKA B, LAMPARSKA-PRZYBYSZ M, MOTYL T. Colocalization of BAX with BID and VDAC-1 in nimesulide-induced apoptosis of human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Anticancer Drugs* 2002; **13**(10): 1017–1029.
- [15] GODLEWSKI MM, MOTYL MA, GAJKOWSKA B, WARESKI P, KORONKIEWICZ M, MOTYL T. Subcellular redistribution of BAX during apoptosis induced by anticancer drugs. *Anticancer Drugs* 2001; **12**(7): 607–617.
- [16] GODLEWSKI MM, JEZERSKA A, GAJKOWSKA B, MOTYL T. Interactions between apoptosis regulating proteins during nimesulide-induced programmed cell death of human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. Apoptosis 2003: From signaling pathways to therapeutic tools. 29.01–1.02 2003, Luxembourg: 538.
- [17] GODLEWSKI MM, GÓRKA M, JEZERSKA A, GAJKOWSKA B, MOTYL T. Homeostatic Confocal Microscopy gives an insight into minute events occurring in mitochondria in cells undergoing apoptosis. 1st International Workshop Slide-Based Cytometry (SBC) 15–17.05 2003, Lipsk, Germany: 12.
- [18] GRINBERG M, SARIG R, ZALTSMAN Y, FRUMKIN D, GRAMMATIKAKIS N, REUVENY E, GROSS A. tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2002; **277**(14): 12237–12245.
- [19] GUO F, NIMMANAPALLI R, PARANAWITHANA S, WITTMAN S, GRIFFIN D, BALI P, O'BRYAN E, FUMEROC, WANG HG, BHALLA K. Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Blood* 2002; **99**(9): 3419–3426.
- [20] HU S, YANG X. Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 2003; **278**(12): 10055–10060.
- [21] HUNTER AM, KOTTACHCHI D, LEWIS J, DUCKETT CS, KORNELUK RG, LISTON P. A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 2003; **278**(9): 7494–7499.

- [22] KANDASAMY K, SRINIVASULA SM, ALNEMRI ES, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ, BRYANT JL, SRIVASTAVA RK. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res* 2003; **63**(7): 1712–1721.
- [23] KASHKAR H, HAEFS C, SHIN H, HAMILTON-DUTOIT SJ, SALVESEN GS, KRONKE M, JURGENSMEIER JM. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* 2003; **198**(2): 341–347.
- [24] KELEKAR A, CHANG BS, HARLAN JE, FESIK SW, THOMPSON CB. Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol* 1997; **17**(12):7040–7046.
- [25] KOLEK O, GAJKOWSKA B, GODLEWSKI MM, MOTYL T. Antiproliferative and apoptotic effect of TGF-beta(1) in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003; **134**(4): 417–430.
- [26] KOLEK O, GAJKOWSKA B, GODLEWSKI MM, MOTYL T. Co-localization of apoptosis-regulating proteins in mouse mammary epithelial HC11 cells exposed to TGF-beta1. *Eur J Cell Biol* 2003; **82**(6):303–312.
- [27] KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, ELLERBY LM, WELSH K, XIE Z, DEVERAUX QL, SALVESEN GS, BREDESEN DE, ROSENTHAL RE, FISKUM G, REED JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**(10):5752–5757.
- [28] KUAI J, NICKBARG E, WOOTERS J, QIU Y, WANG J, LIN LL. Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis. *J Biol Chem* 2003; **278**(16):14363–14369.
- [29] LIU Z, SUN C, OLEJNICZAK ET, MEADOWS RP, BETZ SF, OOST T, HERRMANN J, WU JC, FESIK SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 2000; **408**(6815): 1004–1008.
- [30] MADESH M, ANTONSSON B, SRINIVASULA SM, ALNEMRI ES, HAJNOCZKY G. Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem* 2002; **277**(7): 5651–5659.
- [31] MARTINS LM, IACCARINO I, TENEV T, GSCHMEISSNER S, TOTTY NF, LEMOINE NR, SAVOPOULOS J, GRAY CW, CREASY CL, DINGWALL C, DOWNWARD J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 2002; **277**(1): 439–444.
- [32] McNEISH IA, BELL S, MCKAY T, TENEV T, MARANI M, LEMOINE NR. Expression of Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis via a caspase-9-mediated pathway. *Exp Cell Res* 2003; **286**(2): 186–198.
- [33] MOTYL T, GAJKOWSKA B, PŁOSZAJ T, WARĘSKI P, ORZECZOWSKI A, ZIMOWSKA W, WOJEWÓDZKA U, RYNIWICZ Z, REKIEL A. Rola Bax i Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 31–51.
- [34] NORMANNO N, CAMPIGLIO M, DE LA, SOMENZI G, MAIELLO M, CIARDIELLO F, GIANNI L, SALOMON DS, MENARD S. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. *Ann Oncol* 2002; **13**(1): 65–72.
- [35] OKADA H, SUH WK, JIN J, WOO M, DU C, ELIA A, DUNCAN GS, WAKEHAM A, ITIE A, LOWE SW, WANG X, MAK TW. Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2002; **22**(10): 3509–3517.
- [36] OKANO H, SHIRAKI K, INOUE H, KAWAKITA T, SAITOU Y, ENOKIMURA N, YAMAMOTO N, SUGIMOTO K, FUJIKAWA K, MURATA K, NAKANO T. Over-expression of Smac promotes TRAIL-induced cell death in human hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003; **12**(1): 25–28.
- [37] PUTCHA GV, LE S, FRANK S, BESIRLI CG, CLARK K, CHU B, ALIX S, YOULE RJ, LAMARCHE A, MARONEY AC, JOHNSON EM. JNK-Mediated BIM Phosphorylation Potentiates BAX-Dependent Apoptosis. *Neuron* 2003; **38**(6): 899–914.
- [38] ROUCOU X, MONTESSUIT S, ANTONSSON B, MARTINOUC J. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J* 2002; **368**(Pt 3): 915–921.
- [39] SRINIVASULA SM, DATTA P, FAN XJ, FERNANDES-ALNEMRI T, HUANG Z, ALNEMRI ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 2000; **275**(46): 36152–36157.

- [40] SRINIVASULA SM, HEGDE R, SALEH A, DATTA P, SHIOZAKI E, CHAI J, LEE RA, ROBBINS PD, FERNANDES-ALNEMRI T, SHI Y, ALNEMRI ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; **410**(6824): 112–116.
- [41] SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZAMI N, MARZO I, BRENNER C, LAROCLETTE N, PREVOST MC, ALZARI PM, KROEMER G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999; **189**(2):381–394.
- [42] TAKIMOTO R, EL-DEIRY WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* 2000; **19**(14): 1735–1743.
- [43] TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 2000; **466**(1):6–10.
- [44] VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSCH M, SILKE J, CONNOLLY LM, REID GE, MORITZ RL, SIMPSON RJ, VAUX DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; **102**(1): 43–53.
- [45] VERHAGEN AM, SILKE J, EKERT PG, PAKUSCH M, KAUFMANN H, CONNOLLY LM, DAY CL, TIKOO A, BURKE R, WROBEL C, MORITZ RL, SIMPSON RJ, VAUX DL. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2002; **277**(1): 445–454.
- [46] WERNER AB, DE VRIES E, TAIT SW, BONTJER I, BORST J. TRAIL receptor and CD95 signal to mitochondria via FADD, caspase-8/10, Bid, and Bax but differentially regulate events downstream from truncated Bid. *J Biol Chem* 2002; **277**(43): 40760–40767.
- [47] WU G, CHAI J, SUBER TL, WU JW, DU C, WANG X, SHI Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; **408**(6815): 1008–1012.
- [48] YAMAGUCHI H, BHALLA K, WANG HG. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer Res* 2003; **63**(7): 1483–1489.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 03.10.2003 r.

Przyjęto: 12.12.2003 r.

Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa,

e-mail: t_motyl@hotmail.com

TRANSKRYPCYJNA REGULACJA ADIPOGENEZY*

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF ADIPOGENESIS

Agata CHMURZYŃSKA

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza
im. A. Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: Główną rolą adipocytów jest magazynowanie triacyloglicerolu w okresach nadwyżek energetycznych oraz uwalnianie jego rezerw w momencie niedoboru energii. Adipocyty wykazują również aktywność sekrecyjną, są miejscem syntezy wielu czynników parakrynowych i endokrynowych, m.in. leptyny. Adipogeneza jest wieloetapowym procesem prowadzącym do przekształcenia pierwotnych komórek zarodkowych i preadipocytów w dojrzałe adipocyty. Proces różnicowania podlega kontroli kilku rodzin genów, przede wszystkim PPAR i C/EBP. Polimorfizm tych genów może mieć wpływ na kształtowanie się otyłości u ludzi i cechy otluszczenia zwierząt gospodarskich.

Słowa kluczowe: adipogeneza, czynniki transkrypcyjne, C/EBP, PPAR, CREB, tłuszcz.

Summary: The major role of adipocytes is storing triacylglycerol during periods of energy excess and its mobilization in times of energy deprivation. These cells act also as a secretory organ, that synthesize many paracrine and endocrine hormones, among others leptin. Adipogenesis is a cascade of molecular events that leads to conversion of mesenchymal cells into preadipocytes and finally into mature adipocytes. This process is controlled by several transcription factors, including predominantly members of C/EBP and PPAR families. Polymorphism of genes belonging to C/EBP and PPAR families may have a n influence on human obesity and fatness traits in livestock species.

Key words: adipogenesis, transcription factors, C/EBP, PPAR, CREB, fat.

Różnicowanie komórek zależy od zmiany ekspresji genów, dzięki czemu odpowiednie transkrypty powodują przejście komórki ze stanu multipotentnego do określonego końcowego fenotypu. Ekspresja genów eukariotycznych kontrolowana jest na wielu poziomach, w większości przypadków na poziomie transkrypcji, której wydajność zależy od sekwencji DNA znajdujących się powyżej miejsca inicjacji transkrypcji. Geny podlegające jednemu rodzajowi regulacji, np. aktywowane zmianami

*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu KBN (projekt PBZ-KBN-036/P06/14).

stężenia cAMP, mają wspólne krótkie sekwencje promotorowe. Białka regulatorowe wiążące się z specyficznymi dla siebie elementami promotorowymi wpływają pozytywnie lub negatywnie na efektywność transkrypcji. Czynniki transkrypcyjne, ze względu na pełnione funkcje, zawierać muszą pewne stałe elementy – domenę wiążącą DNA oraz domenę aktywacyjną, często również domenę dimeryzacji [27]. Najczęściej spotykanymi motywami domen wiążących DNA są domeny typu helisa-zwrot-helisa (ang. *helix-turn-helix* – HTH) i palca cynkowego. Dimeryzacja białek zachodzi dzięki motywom helisa-pętla-helisa (HLH, ang. *helix-loop-helix*), a także suwakom leucynowym, którym często towarzyszy zasadowa domena odpowiedzialna za wiązanie z DNA. Łącznie oba te elementy występują w czynnikach transkrypcyjnych typu bZIP (ang. *basic zipper*).

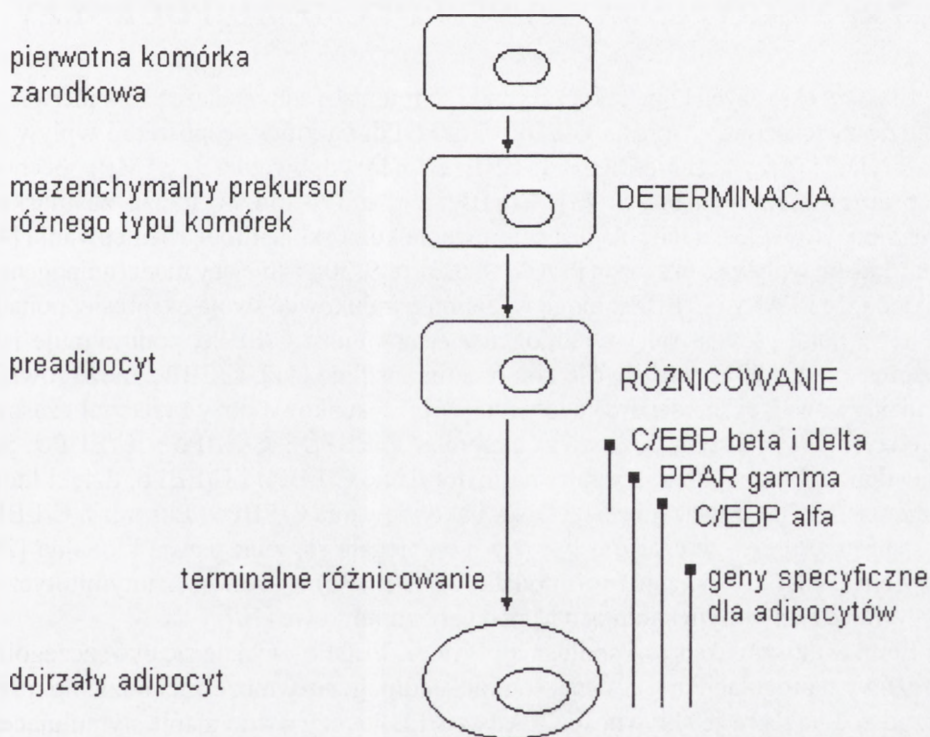
Ostatnie lata obfitują w badania skoncentrowane na poznaniu rozwoju adipocytów i czynników transkrypcyjnych wpływających na ten skomplikowany proces, a także genów zaangażowanych w gospodarkę lipidową. Silnym bodźcem ku temu jest przede wszystkim stale rosnący odsetek osób obarczonych otyłością, która łączy się m.in. ze zwiększoną podatnością na insulinoniezależną cukrzycę czy pewne rodzaje nowotworów [25, 36]. W wypadku zwierząt gospodarskich poszukuje się genów, które mogłyby wpływać na cechy otluszczenia. Do tej pory sporo uwagi poświęcono leptynie i receptorowi leptyny. Mutacje w tych genach, prowadzące do braku w organizmie funkcjonalnych produktów ekspresji, wiązały się m.in. ze skrajną otyłością u myszy [50, 6]. Badania prowadzone na innych gatunkach zwierząt nie ujawniły dotąd mutacji o tak silnym efekcie fenotypowym [7, 45], natomiast u ludzi defekty takie obserwowano raczej sporadycznie [15, 32]. Poznanie molekularnego podłoża adipogenezy może stanowić kolejny krok w kierunku zrozumienia mechanizmów wpływających na kształtowanie się określonej masy ciała.

PRZEBIEG ADIPOGENEZY

Tkanka tłuszczowa jest jednym z głównych rezerwuarów energetycznych organizmu, a wyróżnić można dwa jej rodzaje – białą (ang. *white adipose tissue* – WAT) i brunatną (ang. *brown adipose tissue* – BAT). Jej komponentami są komórki tłuszczowe (adipocyty), a także naczynia krwionośne i limfatyczne oraz tkanka nerwowa. Funkcje adipocytów nie ograniczają się tylko do udziału w metabolizmie lipidów i magazynowaniu kwasów tłuszczowych. Niezwykle istotna jest ich funkcja wydzielnicza. Działanie endokrynowe wykazują m.in. leptyna, angiotensynogen, inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), czynnik martwicy nowotworu (TNF α), interleukina 6 (IL-6) czy adypsyna, które łącznie wpływają na wiele procesów zmierzających do utrzymania energetycznej homeostazy w organizmie [33].

Powiększanie tkanki tłuszczowej obejmuje zarówno hipertrofię (zwiększenie rozmiaru), jak i hiperplazję (zwiększenie liczby komórek). W tym konkretnym przypadku hiperplazja rozumiana jest jako adipogeneza [20]. Jej początek wyznacza proliferacja pierwotnych komórek zarodkowych. Multipotencjalne, mezenchymalne prekursorzy mają

zdolność przekształcania się w różne rodzaje komórek – w chondrocyty, osteoblasty i mioblasty oraz w adipocytarne linie komórkowe. Preadipocytami stają się wówczas, gdy tracą tę właściwość. Różnicowanie preadipocytów polega na zmianie ekspresji genów, między innymi czynników transkrypcyjnych, której skutkiem jest aktywacja genów specyficznych dla adipocytów oraz wykształcenie fenotypu właściwego dla dojrzałej komórki. Podczas różnicowania kształt komórek zmienia się z wrzecionowatego w sferyczny, zmieniają się również składniki cytoszkieletu oraz rodzaj macierzy zewnątrzkomórkowej [18]. W początkowej fazie adipogenezy (pomiędzy fazami G₁ i S cyklu komórkowego), na skutek kontaktu między preadipocytami dochodzi do zatrzymania ich wzrostu, po którym następują jeden lub dwa podziały, tzw. ekspansja klonalna [14, 36]. Chociaż jej istnienie *in vivo* jest dyskusyjne, sugeruje się, że może mieć ona pewne znaczenie ze względu na zachodzące wtedy przeorganizowanie chromatyny, które umożliwia lepszy dostęp białek do DNA [31]. Ekspansja klonalna zostaje wstrzymana równoległe z początkiem ekspresji specyficznych czynników transkrypcyjnych, co z kolei prowadzi do permanentnej inhibicji wzrostu. Od tego momentu komórki nie są zdolne do podziałów i następuje wykształcenie się dojrzałego fenotypu – terminalne różnicowanie [43] (ryc. 1).



RYCINA 1 Schemat adipogenezy (zmodyfikowany, na podstawie [18] Gregoire i wsp., 1998)

Większość informacji o adipogenezie zgromadzono na podstawie badań *in vitro*, co wiąże się z możliwością powstania artefaktów, do których być może należy ekspansja klonalna [43]. Warto także podkreślić, że precyzyjne ustalenie chronologii pomiędzy poszczególnymi etapami adipogenezy następuje wielu trudności, ze względu na dużą liczbę genów, których ekspresja zmienia się podczas tego procesu oraz na odmienność modeli wykorzystanych w badaniach [19].

Na adipogenezę wpływa łączny udział wielu różnych czynników. Wykazano znaczną rolę hormonów w stymulacji procesu różnicowania, m.in. hormonu wzrostu, prostaglandyn oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu I (ang. *insulin-like growth factor*). Inne czynniki wzrostowe oraz cytokiny wydają się być inhibitorami różnicowania, wymienić tu można chociażby TGF α (ang. *transforming growth factor*) czy EGF (ang. *epidermal growth factor*) [31]. Koordynacja procesu różnicowania obejmuje prawidłowy odbiór sygnałów dochodzących do komórki, który prowadzić ma do ekspresji określonych genów. Jednym z elementów regulatorowych jest transaktywujące działanie kilku rodzin czynników transkrypcyjnych.

WSPÓLDZIAŁANIE POMIĘDZY RÓŻNYMI CZYNNIKAMI TRANSKRYPCYJNYMI W PROCESIE ADIPOGENEZY

Efektem ekspozycji komórek na czynniki stymulujące adipogenezę jest w pierwszym rzędzie zwiększona ekspresja C/EBP β i C/EBP δ , na którą bezpośredni wpływ ma fosforylacja i przyłączanie CREB do CRE (element odpowiedzi na cAMP) obecnego w promotorach tych białek [3]. C/EBP β i C/EBP δ można uznać za markery preadipocytów [33], a ich rolą jest skierowanie komórki na drogę różnicowania [49] oraz dodatni wpływ na ekspresję PPAR γ i C/EBP α [9, 30]. Istniejący model adipogenezy zakłada, że PPAR γ i C/EBP α mogą wzajemnie indukować swoją ekspresję, ponadto PPAR γ pełni główną rolę w adipogenezie, natomiast C/EBP α podtrzymuje jego ekspresję i kształtuje wrażliwość komórek na insulinę [41]. C/EBP α może również autoaktywować ekspresję swojego genu [26]. Stosunkowo duży przedział czasowy między maksymalnym poziomem ekspresji C/EBP β i C/EBP δ a C/EBP α jest prawdopodobnie wykorzystywany na fosforylację C/EBP β i C/EBP δ , dzięki której mają one zdolność wiązania się z DNA i aktywowania C/EBP α . Ekspresja C/EBP α zostaje przesunięta w czasie o tyle, by nie zbiegała się z ekspansją klonalną [26], bowiem C/EBP α wykazuje (oraz dodatkowo C/EBP ξ) właściwości antymitotyczne, wpływając tym samym hamująco na podziały komórkowe [10].

Etap, w którym ekspresji podlegają PPAR γ i C/EBP α , wydaje się być szczególnie wrażliwy na regulację negatywną. Inhibicja adipogenezy może zachodzić np. przez bezpośrednią represję aktywności PPAR γ i C/EBP α , czy wstrzymanie stymulującego wpływu C/EBP β [31].

W terminalnej fazie różnicowania znacząco zwiększa się lipogeneza *de novo*, a komórki stają się bardziej wrażliwe na działanie insuliny. Wzrasta także poziom mRNA dla białek bezpośrednio związanych z metabolizmem lipidów, a także produktów specyficznych dla adipocytów. Koordynacja ekspresji genów właściwych dla adipocytów należy do PPARy i C/EBP α [18]. Dodatkowo udział w aktywacji niektórych genów może mieć również CREB. Prawdopodobne miejsce jego przyłączenia zlokalizowano m.in. w promotorze genu leptyny [16].

BUDOWA BIAŁEK I GENÓW CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH KLUCZOWYCH DLA PRZEBIEGU ADIPOGENEZY

Na zmianę ekspresji genów w dojrzewających adipocytach wpływają przede wszystkim dwie grupy czynników transkrypcyjnych – PPAR i C/EBP. Białka PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) należą do nadrodziny steroidowych receptorów jądrowych – NHR (ang. *nuclear hormone receptor*), które regulują metabolizm lipidów i różnicowanie tkanek. Rodzina PPAR obejmuje PPAR α , PPAR δ , oraz trzy formy PPARy [8]. Białka PPAR nie odbiegają strukturą od innych członków nadrodziny NHR. Tworzą ją N-końcowa domena o potencjalnych możliwościach transaktywacji (AF-1), domena wiążąca DNA zawierająca dwa palce cynkowe oraz domeny dimeryzacji i przyłączania ligandu (AF-2) [42]. Najbardziej zachowawczą strukturą charakteryzują się fragmenty polipeptydu odpowiedzialne za wiązanie się z DNA [51]. Co więcej, ortologiczne formy genu zachowują konserwatyzm na poziomie 96–98% (podobieństwo dotyczy genów świni, człowieka, myszy i bydła) [22].

Aktywacja PPAR może zachodzić w dwojaki sposób. Po pierwsze przez przyłączenie, niekiedy tkankowo specyficznych ligandów – koaktywatorów lub korepresorów (m.in. kwasów tłuszczowych i prostaglandyn), które oddziałują na proces transkrypcji przez przemodelowanie struktury chromatyny lub/i jako cząstki adapterowe przyłączające kompleks receptora jądrowego do podstawowego aparatu transkrypcyjnego [23]. Ze względu na możliwość przyłączania różnorodnych ligandów, domenę odpowiedzialną za ten proces cechuje nieco mniejszy konserwatyzm międzygatunkowy niż w przypadku fragmentu polipeptydu łączącego białko z DNA [24]. Drugi rodzaj aktywacji nie zależy od ligandu, fragment za nią odpowiedzialny znajduje się na N-końcu łańcucha polipeptydowego [48]. W jej obrębie znajduje się miejsce rozpoznawane przez kinazę MAP, która przez fosforylację może redukować aktywność domeny [1].

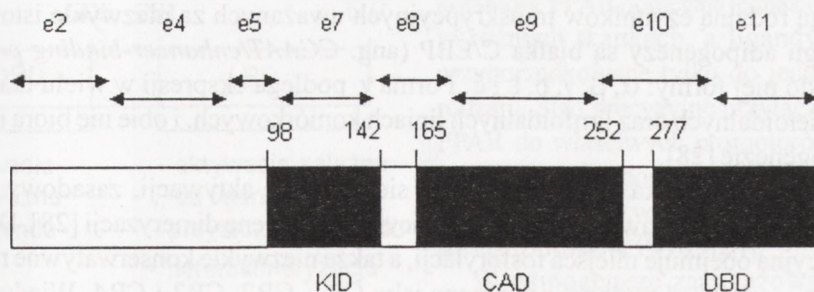
Miejsce, do którego PPAR przyłącza się do DNA, w postaci heterodimeru z innym czynnikiem transkrypcyjnym, np. RXR (ang. *retinoid receptor X*), stanowią dwie sekwencje AGGTCA, rozdzielone jednym nukleotydem, łącznie określane symbolem DR-1 [8]. Jest to tzw. element odpowiedzi na PPAR (ang. *PPAR response element* – PPRE). Wybiórcze działanie czynników transkrypcyjnych osiągane jest przez: ich tkankowo specyficzną ekspresję w określonym czasie, rozpoznawanie ściśle określonych sekwencji w promotorze oraz aktywację przez tkankowo specyficzne ligandy i

Drugą rodziną czynników transkrypcyjnych uważanych za niezwykle istotne dla przebiegu adipogenezy są białka C/EBP (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein*). Należą do niej formy: α , β , γ , δ , ϵ i ξ . Forma γ podlega ekspresji w wielu tkankach, a ϵ w mieloidalnych oraz limfoidalnych liniach komórkowych, i obie nie biorą udziału w adipogenezie [28].

W strukturze białka C/EBP wyróżnia się: domenę aktywacji, zasadowy region wiążący się z DNA i zawierającą suwak leucynowy domenę dimeryzacji [28]. Domena aktywacyjna obejmuje miejsca fosforylacji, a także niezwykle konserwatywne regiony CR (ang. *conserved regions*) oznaczone jako CR1, CR2, CR3 i CR4. Wiadomo, że białko powstałe z fuzji suwaka leucynowego i regionu CR2 zdolne jest stymulować proces różnicowania komórek [11].

Z podobieństwa genów C/EBP wnioskować można, że ich powstanie wiąże się z serią duplikacji, które mogły zajść w trakcie ewolucji [28]. Gen C/EBP α nie ma intronów i koduje dwie izoformy powstające z jednego rodzaju mRNA – pełnej długości produkt o masie 42kDa oraz produkt o masie 30 kDa, którego translacja rozpoczyna się od trzeciego kodonu AUG w tej samej ramce odczytu. Pierwsze dwa kodony AUG są ignorowane przez rybosomy (ang. *ribosomal scanning*) [29, 37]. Podobnie jak w przypadku C/EBP α , dwa typy białka C/EBP β powstają z jednego mRNA. Forma krótsza składa się wyłącznie z domen dimeryzacji i wiązania się z DNA. Gen C/EBP δ także nie ma intronów, a jego ekspresja poza adipocytami zachodzi również w jelitach i płucach. Natomiast w skład genu C/EBP ξ , wchodzi cztery eksony, a jego długość wynosi łącznie około 5 kpz. Ekspresja C/EBP ξ nie jest ograniczona wyłącznie do adipocytów [28].

Wzrost komórek może być modyfikowany przez poziom cyklicznego AMP. W zależności od typu komórek cAMP wykazuje właściwości mitogenu, antymitogenu bądź promuje różnicowanie. Wykazano, że cAMP przyspiesza początkowe fazy różnicowania adipocytów, równocześnie inhibuje również jego fazę terminalną [46]. Jednym z białek, przez które oddziałuje cAMP, jest czynnik transkrypcyjny CREB (ang. *cAMP response element binding protein*), którego istotną rolę w adipogenezie postulowała Reusch [39]. CREB wpływa na ekspresję genów zawierających w promotorze ośmionukleotydową sekwencję palindromową TGACGTCA, tzw. element odpowiedzi na cAMP (ang. *cAMP response element*, CRE). Element ten zidentyfikowano m.in. w genie somatostatyny i karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej (ang. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PEPCK) [38]. Na końcu aminowym białka znajdują się miejsca rozpoznawane przez kinazy A, C oraz kazeinową kinazę II [17], a na końcu karboksylowym region tworzący suwak leucynowy (Hoeffler i wsp., 1988). Ponadto wyróżnić można domeny KID (ang. *kinase inducible domain*), którą tworzą aminokwasy 98–142, CAD (ang. *constitutive activation domain*) mieszcząca się między aminokwasami 165–252 oraz DBD (ang. *DNA binding domain*) – od 272 aminokwasu do końca białka. Żadna z tych domen nie jest kodowana przez pojedynczy ekson – ryc. 4 [38]. Gen CREB podzielony jest na 10 intronów i 11 eksonów, które tworzyć mogą wiele form białek [44]. U człowieka wykryto dwie aktywne formy CREB: CREB-327 oraz CREB-341 zawierającą dodatkowe 14 aminokwasów [4].



RYCINA 4 Struktura białka CREB. Na rysunku schematycznie zaznaczono eksony kodujące poszczególne części białka, a także domeny KID, CAD i DBD (liczby oznaczają odpowiednie aminokwasy) (zmodyfikowany, na podstawie [38])

PODSUMOWANIE

Badania *in vitro* oraz analiza ekspresji genów za pomocą chipów DNA [5, 35] dowodzą niezbitą zasadniczej roli, jaką odgrywają w procesie adipogenezy rodziny białek PPAR i C/EBP. Jednakże jej prawidłowy przebieg uwarunkowany jest wieloma czynnikami, do których należą m.in. hormony i cytokiny. Wiele jeszcze czynników pozostaje nieznanymi. Dogłębne poznanie genów zaangażowanych w różnicowanie adipocytów, ich produktów oraz mechanizmów ich funkcjonowania może mieć niebagatelne znaczenie dla rozwoju nowych metod terapeutycznych. Defekty systemu kontrolującego adipogenezę skutkować mogą występowaniem poważnych chorób, coraz częstszych obecnie cukrzycy i otyłości. Potencjalne zastosowanie farmakologiczne mają np. TZD – aktywatory PPAR γ [8, 23]. Pełne poznanie procesu adipogenezy będzie miało też znaczenie w hodowli zwierząt w kontekście zmienności cech otluszczenia.

LITERATURA

- [1] ADAMS M, REGIONATO MJ, SHAO D, LAZAR MA, CHATTERJEE VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 1997; **272**: 5128–5132.
- [2] BARROSO I, GURNELL M, CROWLEY VEF, AGOSTINI M, SCHWABE JW, SOOS MA, MASLEN GL, WILLIAMS TDM, LEWIS H, SCHAFFER AJ, CHATTERJEE VKK, O'RAHILLY S. Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; **402**: 880–883.
- [3] BELMONTE N, PHILLIPS BW, MASSIERA F, VILLAGEOIS P, WZDIEKONSKI B, SAINT-MARC P, NICHOLS J, AUBERT J, SAEKI K, YUO A, NARUMIYA S, AILHAUD G, DANI C. Activation of extracellular signal-regulated kinases and CREB/ATF-1 mediate the expression of CCAAT/enhancer binding proteins β and δ in preadipocytes. *Mol Endocrinol* 2001; **15**(11): 2037–2049.
- [4] BERKOWITZ L A, GILMAN MZ. Two distinct forms of active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5258–5262.
- [5] BURTON GR, GUAN Y, NAGARAJAN R, McGEHEE RE. Microarray analysis of gene expression during early adipocyte differentiation. *Gene* 2002; **293**: 21–31.

- [6] CHEN H, CHARLAT O, TARTAGLIA LA, WOOLF EA, WENG X, ELLIS SJ, LAKEY ND, CULPEPPER J, MOORE KJ, BREITBART RE, DUYK GM, TEPPER RI, MORGENSTERN JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; **84**: 491–495.
- [7] CHMURZYŃSKA A, ZAJĄC M, ŚWITOŃSKI M. Molecular evolution of the leptin exon 3 in some species of the family *Canidae*. *Genet Sel Evol* 2003; **35**: 573–580.
- [8] CLARKE SD, THUILLIER P, BAILLIE RA, SHA X. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *American J Clin Nutr* 1999; **70**: 566–571.
- [9] COWHERD RM, LYLE RE, McGEHEE RE. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Cell Dev Biol* 1999; **10**: 3–10.
- [10] DARLINGTON GJ, ROSS SE, MacDOUGALD OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1998; **273**: 30057–30060.
- [11] ERICKSON RL, HEMATI N, ROSS SE, MacDOUGALD OA. p300 coactivates the adipogenic transcription factor CAAT/enhancer-binding protein α . *J Biol Chem* 2001; **276**: 16348–16355.
- [12] FAJAS L, AUBOEUF D, RASPE E, SCHOONJAN K, LEFEBVRE AM, SALADIN R, NAJIB J, LAVILLE M, FRUCHART JC, DEEB S, VIDAL-PUIG A, FLEIR J, BRIGGS MR, STAELS B, VIDAL H, AUWERX J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18779–18789.
- [13] FAJAS L, FRUCHART JC, AUWERX J. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters* 1998; **438**: 55–60.
- [14] FAJAS L, FRUCHART JC, AUWERX J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 165–173.
- [15] FAROOQI IS, KEOGH JM, KAMATH S, JONES S, GIBSON WT, TRUSSELL R, JEBB SA, LIP GYH, O'RAHILLY S. Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature* 2001; **414**: 34–35.
- [16] GONG DW, BI S, PRATLEY RE, WEINTRAUB BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 1996; **271**: 3971–3974.
- [17] GONZALEZ GA, YAMAMOTO KK, FISCHER WH, KARR D, MENZEL P, BIGGS W, VALE WW, MONTMINY MR. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 1989; **337**: 749–752.
- [18] GREGOIRE FM, SMASCM, SUL HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; **78**: 783–809.
- [19] GREGOIRE FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med* 2001; **226**(11): 997–1002.
- [20] HAUSMAN DB, DiGIROLAMO M, BARTNESS TJ, HAUSMAN GJ, MARTIN RJ. The biology of white adipose proliferation. *Obesity Rev* 2001; **2**: 239–254.
- [21] HOEFFLER JP, MEYER TE, WAEBER G, HABENER JH. Multiple adenosine 3', 5'-monophosphate response element DNA-binding proteins generated by gene diversification and alternative exon splicing. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 920–930.
- [22] HOUSEKNECHT KL, BIDWELL CA, PORTOCARRERO CP, SPURLOCK ME. Expression and cDNA cloning of porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *Gene* 1998; **225**: 89–96.
- [23] HOUSEKNECHT KL, COLE BM, STEELE PJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrin* 2002; **22**: 1–23.
- [24] JUGE-AUBRY C, PERNIN A, FAVEZ T, BURGER AG, WAHLI W, MEIER CA, DESVERGNE B. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25252–25259.
- [25] KULKARNI SK, KAUR G. Obesity: an insight into its neurochemical basis and treatment. *Indian J Pharmacol* 1999; **31**: 388–403.
- [26] LANE MD, TANG QQ, JIANG MS. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; **266**: 677–683.
- [27] LATCHMAN DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 1305–1312.
- [28] LEKSTROM-HIMES J, XANTHOPOULOS KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28545–28548.
- [29] LIN FT, MacDOUGALD OA, DIEHL AM, LANE MD. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein α message: Transcriptional activator lacking antimetabolic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 9606–9610.
- [30] LOFTUS TM, LANE MD. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1997; **7**: 603–608.

- [31] MACDOUGALD OA, MANDRUP S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrin Met* 2002; **13**: 5–11.
- [32] MONTAGUE CT, FAROOQI IS, WHITEHEAD JP, SOOS MA, RAU H, WAREHAM NJ, SEWTER CP, DIGBY JE, MOHAMMED SN, HURST JA, CHEETHAM CH, EARLEY AR, BARNETT AH, PRINS JB, O'RAHILLY S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; **387**: 903–908.
- [33] MORRISON RF, FARMER SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 2000; **130**: 3116S–3121S.
- [34] MUELLER E, DRORI S, AIYER A, YIE J, SARRAF P, CHEN H, HAUSER S, ROSEN ED, GE K, ROEDER RG, SPIEGELMAN BM. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor γ isoforms. *J Biol Chem* 2002; **277**: 41952–41930.
- [35] NAKAMURA T, SHIOJIMA S, HIRAI Y, IWAMA T, TSURUZOE N, HIRASAWA A, KATSUMA S, TSUJIMOTO G. Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; **303**: 306–312.
- [36] NTAMBI JM, KIM Y-C. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000; **130**: 3122S–3126S.
- [37] OSSIPOV V, DESCOMBES P, SCHIBLER U. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8219–8223.
- [38] QUINN P. Mechanisms of basal and kinase-inducible transcription activation by CREB. *Prog Nucleic Acids Rev* 2002; **72**: 269–306.
- [39] REUSCH JE, COLTON LA, KLEMM DJ. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1008–1020.
- [40] RISTOW M, MÜLLER-WIELAND D, PFEIFFER A, KRONE W, KAHN CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 1998; **339**: 953–959.
- [41] ROSEN ED, HSU CH, WANG X, SAKAI S, FREEMAN MW, GONZALEZ FJ, SPIEGELMAN BM. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 2002; **16**: 22–26.
- [42] ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37731–37734.
- [43] ROSEN ED, WALKER CJ, PUIGSERVER P, SPIEGELMAN BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000; **14**: 1293–1307.
- [44] RUPPERT S, COLE TJ, BOSHART M, SCHMIDT E, SCHUTZ G. Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes. *EMBO J* 1992; **11**: 1503–1512.
- [45] ŚWITOŃSKI M, CHMURZYŃSKA A, MAĆKOWSKI M. Searching for genes controlling fatness traits in pigs – a review. *Anim Sci Pap Rep* 2003; **21**: 73–86.
- [46] YARWOOD SJ, KILGOUR E, ANDERSON NG. Cyclic AMP potentiates growth hormone-dependent differentiation of 3T3-F442A preadipocytes: possible involvement of the transcription factor CREB. *Mol Cell Endocrinol* 1998; **138**: 41–50.
- [47] VALVE R, SIVENIUS K, MIETTINEN R, PIHLAJAMÄKI J, RISSANEN A, DEEB SS, AUWERX J, UUSITUPA M, LAAKSO M. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 3708–3712.
- [48] WERMAN A, HOLLENBERG A, SOLANES G, BJORBAEK C, VIDAL-PUIG A, FLIER JS. Ligand-independent activation domain in the N-terminus of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 1997; **272**: 20230–20235.
- [49] WU Z, PUIGSERVER P, SPIEGELMAN BM. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 689–694.
- [50] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**: 425–431.
- [51] ZHU Y, ALVARES K, HUANG Q, SAMBASIVA RAO M, REDDY JK. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26817–26820.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 08.12.2003 r.

Przyjęto: 17.12.2003 r.

ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

e-mail: agata@jay.au.poznan.pl

TERAPIA GENOWA KOMÓREK UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO: ROZWÓJ STRATEGII I WEKTORÓW

GENE THERAPY OF HEMATOPOIETIC CELLS:
DEVELOPMENT OF STRATEGIES AND VECTORS.

Urszula WOJDA

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Streszczenie: Na przestrzeni ostatniej dekady obserwowany był znaczący rozwój strategii terapii genowych w układzie krwiotwórczym, od prób korekcji zmutowanego genu w chorobach jednogenowych do badań nad zastosowaniem transferu genów w transplantologii, leczeniu nowotworów i AIDS. Intensywnie bada się możliwości terapii wykorzystując genetycznie modyfikowane komórki macierzyste – wyniki uzyskane dotychczas w modelach zwierzęcych są zachęcające. Zastosowanie terapii genowej wymaga udoskonalenia metod transferu genów i zapewnienia bezpieczeństwa ich stosowania. Wszystkie wektory genowe zarówno wirusowe, jak i biochemiczne, charakteryzują się pewnymi ograniczeniami i zagrożeniami. Udoskonalanie wektorów biochemicznych i wirusowych podlega tym samym zasadom, wynikającym z konieczności pokonania przez transgen bariery błony komórkowej, wydostania się z endosomu do cytoplazmy, a wreszcie wnikięcia do jądra i uzyskania kontrolowanej ekspresji na terapeutycznym poziomie. Mimo znaczącego postępu metodologicznego, zapewnienie pełnego bezpieczeństwa terapii genowej jest wciąż wyzwaniem wymagającym dalszych intensywnych badań.

Słowa kluczowe: terapia genowa, komórki hematopoetyczne, wektory wirusowe, wektory niewirusowe.

Summary: Last decade witness development of gene therapy strategies in hematopoietic system from attempts of correcting mutated genes in monogenic diseases till research on applications in transplantology, cancer therapy, and AIDS. Intensive research concerns therapeutic use of genetically modified human stem cells with encouraging results achieved in animal models. Fulfillment of gene therapy potential requires improvements in gene transfer methods and providing their safety. All gene therapy vectors, both viral-based and biochemical, are characterized by certain limitations and safety risks. Upgrading of viral and biochemical vectors are governed by the same requirements for transgene delivery through the cell membrane barrier, escape from endosomal compartment, and finally entry to the nucleus and achieving controlled gene expression at therapeutic level. Despite significant methodological progress, providing safety of gene therapy still represents a challenge and requires further intensive research.

Key words: gene therapy, hematopoietic cells, viral vectors, nonviral vectors.

KOMÓRKI UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO JAKO CEL MODYFIKACJI GENETYCZNYCH

Rozwój technik modyfikacji genetycznych komórek służy badaniom podstawowym procesów biologicznych, jak też budzi nadzieje na zastosowania terapeutyczne. Przedmiotem wielu badań nad transferem DNA stały się komórki układu krwiotwórczego człowieka. Komórki te są stosunkowo łatwo dostępne, mogą być wyizolowane z krwi lub ze szpiku kostnego, poddane modyfikacjom genetycznym *ex vivo*, a następnie wprowadzone z powrotem do organizmu dawcy (terapia *ex vivo*, terapia komórkowa). Szczególnie dużo nadziei wiąże się z terapią genową krwiotwórczych komórek macierzystych (*hematopoietic stem cells*, HSC). HSC charakteryzują dwie unikalne cechy: samoodnawialność oraz zdolność różnicowania się we wszystkie typy komórek krwi. Z tego względu modyfikacja genetyczna niewielkiej ilości HSC może dostarczyć stabilnej populacji genetycznie zmienionych komórek w obrębie każdej linii hematopoetycznej. U dorosłych osobników HSC znajdują się głównie w szpiku kostnym, gdzie stanowią niezwykle małą frakcję, ok. 0,01%. Ta niewielka liczba komórek ma ogromny potencjał proliferacyjny – w wyniku różnicowania dostarcza około 5×10^{17} dojrzałych komórek krwi dziennie. Proces hematopoezy jest ściśle regulowany przez czynniki wzrostowe i przebiega w obrębie każdej linii hematopoetycznej według tego samego hierarchicznego wzoru. HSC generują najpierw niezdolne już do samoodnowy komórki progenitorowe, które w wyniku dalszego różnicowania stają się komórkami prekursorowymi szpiku, przeobrażającymi się ostatecznie w dojrzałe komórki krwi. Wykorzystanie niezwykle dużego potencjału HSC wymaga umiejętności ich identyfikowania, oczyszczania oraz hodowli. Brak jest specyficznego markera HSC. Powszechnie izoluje się ze szpiku komórki charakteryzujące się obecnością antygenu adhezji CD34. Antygen ten (sialomucyna) występuje na części HSC oraz na większości komórek progenitorowych. Źródłem komórek CD34+ może być oprócz szpiku także krew obwodowa lub pępowinowa, przy czym ilościowy skład tych populacji CD34+ jest nieco inny [40]. Wzbogacenie krwi obwodowej w komórki CD34+ (tzw. mobilizację) można osiągać działając na szpik hematopoetycznymi czynnikami wzrostowymi, takimi jak: G-CSF, GM-CSF, SCF [24]. Komórki CD34+ mają zdolność rekonstrukcji systemu hematopoetycznego napromienionych zwierząt i są celem modyfikacji genetycznych w transplantologii oraz w próbach leczenia chorób genetycznych, nowotworów, czy AIDS [16, 21]. Trwają też intensywne prace nad lepszą antygenową identyfikacją HSC. Subpopulacja komórek CD34+, która nie wykazuje obecności żadnych antygenów specyficznych dla różnych linii hematopoetycznych, jak też brak antygenu aktywacji różnicowania CD38 (komórki CD34+Lin-CD38-) jest wzbogacona w HSC. Dodatkowo, HSC są identyfikowane na podstawie poziomu ekspresji innych antygenów, w tym Thy1 (CD90), KDR, receptora c-kit (CD34+CD38-Thy1+KDR+c-kit+) [40]. Do identyfikacji subpopulacji CD34+ czy innych subpopulacji komórek krwi stosuje się najczęściej przeciwciała. Komórki o określonym profilu fenotypowym mogą być izolowane metodami immunopowinowactwa, z zastosowaniem pokrytych przeciwciałami kuleczek magnetycznych, które wraz z przyłączonymi komórkami można

zgrupować w polu magnetycznym. Połączenie biotynylowanych przeciwciał z komórkami umożliwia ich izolację na kolumnach z immobilizowaną awidyną, zaś zastosowanie przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie pozwala na izolację komórek przy użyciu cytometrii przepływowej. Otrzymane komórki mogą być następnie modyfikowane genetycznie. Oprócz komórek macierzystych i progenitorowych, celem modyfikacji genetycznych są najczęściej komórki obrony immunologicznej – limfocyty i komórki dendrytyczne [52]. Komórki krwi mogą też być celem systemowej terapii genowej.

CHOROBY I STRATEGIE

W przypadku układu krwiotwórczego modyfikacje genetyczne mają potencjał terapeutyczny dla korekcji szerokiego spektrum schorzeń (tab. 1). Aby zrealizować te potencjalne możliwości, w ostatnim dziesięcioleciu podjęto bardzo intensywne badania laboratoryjne rozwijając i testując różnorodne strategie terapii genowej.

Choroby jednogenowe

Pierwszą chorobą leczoną metodą terapii genowej (kliniczne próby rozpoczęto już w początku lat dziewięćdziesiątych) był ostry, złożony zespół niedoboru odporności (SCID), spowodowany zaburzeniem funkcji limfocytów B i T w wyniku niedoboru enzymu deaminazy adeniny (ADA-SCID) [1]. Transferu terapeutycznego transgenu dokonywano *ex vivo* do limfocytów krwi obwodowej. Metodę tę stosowano także w przypadku X-SCID, związanej z mutacją w chromosomie X [13]. Najbardziej efektywna okazała się terapia modyfikowanymi genetycznie komórkami CD34+, zapewniając u pacjentów wieloletnią ekspresję transgenu w liniach limfoidalnych [28]. Mimo wciąż nie w pełni wyjaśnionych kwestii bezpieczeństwa, transplantacja modyfikowanych HSC

TABELA 1. Proponowane strategie terapii genowej w układzie krwiotwórczym

Rodzaj zaburzenia	Strategie
Choroby jednogenowe	Wprowadzanie terapeutycznego genu Hamowanie ekspresji zmutowanego genu
Nowotwory	Inhibicja ekspresji onkogenu Aktywacja apoptozy Chemioterapia molekularna (geny samobójcze) Immunopotencjacja (m.in. szczepionka antynowotworowa) Hamowanie angiogenezy Genetyczna chemoprotekcja szpiku
Transplantologia	Wytworzenie immunotolerancji u biorcy Lokalna immunosupresja
AIDS	Inhibicja białek związanych z cyklem życiowym HIV-1 Szczepionka (?)

rokuje najwięcej nadziei na skuteczne leczenie nie tylko SCID, ale także wielu innych niedoborów enzymatycznych, jak też takich chorób, jak anemia Fanconiego [17] czy hemoglobinopatie [43]. Mimo że podłoże genetyczne anemii sierpowatej czy β -talasemii jest znane od lat, wciąż brak skutecznych metod długoterminowej korekcji defektów genu β -globiny. Najnowsze próby wprowadzania do krwiobiegu komórek macierzystych transdukowanych genem ludzkiej β -globiny okazały się skuteczne w mysich modelach tych schorzeń [34]. Skuteczność metody w modelach zwierzęcych nie gwarantuje jednak pomyślnego stosowania jej u ludzi i wymaga dalszych badań związanych m.in. z tkankowospecyficzną kontrolą ekspresji genu β -globiny czy bezpieczeństwa transplantacji oraz prawidłowej hematopoezy tak modyfikowanych HSC.

Nowotwory

Od wielu lat rozwijane są liczne strategie terapii genowej skierowane wobec komórek nowotworowych układu krwiotwórczego. Są one oparte na inaktywacji onkogenów technikami antysensownych oligonukleotydów i interferencji RNA [53], aktywacji apoptozy, w tym przez wprowadzanie prawidłowych genów supresorowych nowotworów, takich jak p53 [38, 14] oraz chemioterapii molekularnej polegającej na wprowadzaniu do komórek nowotworowych genu „samobójcy” [20]. Opracowano także liczne metody immunopotencjacji, czyli zwiększania efektywności odpowiedzi immunologicznej przeciw nowotworowi, w których modyfikacjom genetycznym poddaje się nie tylko komórki nowotworowe, ale głównie limfocyty oraz komórki prezentujące antygen [25]. Immunopotencjacja, przez udział komórek systemu immunologicznego, może być metodą leczenia szerokiego spektrum nowotworów nie tylko hematologicznych. Wiele badań nad immunopotencjacją ma na celu opracowanie „szczepionki przeciwnowotworowej” [51, 3]. Obiecującą strategią wydaje się w tym zakresie wprowadzanie genów determinant antygenowych nowotworu do komórek dendrytycznych, a następnie immunizacja komórkami prezentującymi te determinanty [29]. Szereg prób intensyfikacji odpowiedzi przeciwnowotworowej opiera się na wprowadzaniu lokalnie do komórek nowotworu lub do limfocytów naciekających guz, genów antynowotworowych cytokin, takich jak: IL-2, IL-12, TNF- α , jak też różnych kombinacji genów cytokin oraz genów zgodności tkankowej [5]. Nowy wątek badań nad immunopotencjacją związany jest z transformującym czynnikiem wzrostu β (TGF- β). Większość złośliwych nowotworów wykazuje zwiększoną ekspresję TGF- β , silnego immunosupresora, który maskuje obecność antygenów nowotworowych. Sam TGF- β hamuje wzrost nowotworu, ale komórki nowotworowe stają się niewrażliwe na tę cytokinę, najczęściej w wyniku utraty odpowiedniego receptora. Neutralizacja TGF- β (inhibitory, przeciwciała), lub inhibicja jego ekspresji (terapia genowa) okazała się efektywną metodą leczenia nowotworów w wielu modelach zwierzęcych [29]. Oprócz wpływu immunosupresyjnego, TGF- β stymuluje także rozrost naczyń krwionośnych guza nowotworowego, co z kolei warunkuje wzrost nowotworu i zdolność do przerzutów. Próby hamowania angiogenezy w nowotworach, poza inaktywacją genu TGF- β , opierają się najczęściej na wprowadzaniu genów antyangiogenetycznych peptydów, np. angiostatyny czy endostatyny [18]. Terapia genowa ma w tym przypadku potencjał produkowania terapeutycznego czynnika w wysokim

steżeniu w wybranym miejscu, np. w tworzącym naczynia endotelium. Duże nadzieje na docieranie z terapeutycznym genem do miejsc angiogenezy wiąże się z infuzją modyfikowanych HSC [19]. W modelu mysim wprowadzenie genów samobójczych do subpopulacji komórek CD34+ szpiku, które jak wykazano docierały w miejsca angiogenezy, spowodowało znaczące zahamowanie wzrostu guza. Jako gen samobójczy na ogół stosuje się gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki. Enzym kodowany przez ten gen przekształca podawany gancyklowir w substancję o właściwościach toksycznych. Metody terapii genowej coraz częściej stosowane są też jako uzupełnienie terapii klasycznych. Ciekawym podejściem jest tzw. genetyczna chemoprotekcja krwiotwórczych komórek szpiku w czasie klasycznej chemioterapii nowotworów [7, 45]. Na skutek cytotoksycznego działania chemioterapeutyków u pacjentów często dochodzi do chronicznego uszkodzenia komórek szpiku i zaburzenia prawidłowej produkcji komórek krwi (mielosupresja). Aby przeciwdziałać temu zjawisku, podjęto próby wprowadzania do komórek szpiku genów kodujących białka oporności na leki, takie jak MDR1. Produkt tego genu działa jak pompa usuwająca z komórki wiele toksycznych związków, a ulegając ekspresji w komórkach nowotworowych warunkuje ich oporność wobec chemioterapeutyków. W modelach zwierzęcych wykazano skuteczność ochrony szpiku nie tylko dla MDR1, ale także dla dwu innych genów istotnych dla przeżycia komórki enzymów, DHFR oraz MGMT. Geny zapewniające ochronę komórek szpiku przed związkami toksycznymi zarazem warunkują przewagę selekcyjną chronionej subpopulacji komórek. Podejmuje się próby wykorzystania tego efektu dla wprowadzenia do szpiku, przez kotransdukcję, innych terapeutycznych genów, które same nie zapewniają przewagi selekcyjnej. Przykładem tej strategii jest koekspresja MDR1 oraz gp91 – genu, którego mutacje są odpowiedzialne za ziarnicę złośliwą, w komórkach szpiku myszy, co zaowocowało długoterminową ekspresją obu genów po wprowadzeniu tak zmodyfikowanych komórek szpiku do organizmu [47].

Transplantologia

Wiele badań dotyczy zastosowania terapii genowej jako narzędzia wspomagającego przeszczepianie tkanek i organów [23]. Jedną ze strategii jest wytworzenie u biorcy immunotolerancji na antygeny dawcy. Przed transplantacją do komórek biorcy wprowadza się geny głównych antygenów zgodności tkankowej (MHC). Inną drogą hamowania reakcji odrzucania przeszczepu jest wprowadzanie do przeszczepianych komórek lub lokalnie do miejsc docelowych przeszczepu genów kodujących immunosupresyjne cytokiny (IL10, TGF- β) lub czynniki hamujące ko-stymulację limfocytów T, np. CD158. Powodzenie tej strategii daje nadzieje na wyeliminowanie konieczności systemowego podawania leków immunosupresyjnych (cyklosporyna, kortykosterydy, rapamycyna), które zwiększają ryzyko infekcji i powstania nowotworów. Odrzucaniu przeszczepu towarzyszy wzrost liczby cząsteczek międzykomórkowej adhezji komórkowej (ICAM-1), nabłonkowego czynnika wzrostu naczyń VEGF oraz zaburzenie poziomu syntazy NO. Pozytywne wyniki zapobiegania tym zmianom w modelach mysich uzyskano m.in. poprzez blokowanie techniką antysensu mRNA ICAM i VEGF oraz przez wprowadzanie genu indukowanej syntazy NO.

AIDS

AIDS jest chorobą zakaźną, wywoływaną przez wirusa HIV-1 atakującego limfocyty T CD4+ oraz makrofagi. U około 50% pacjentów nie jest skuteczna terapia HAAT (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) oparta na stosowaniu kombinacji inhibitorów odwrotnej transkryptazy wirusa. Skłania to badaczy do poszukiwań rozwiązań z zakresu terapii genowej [22, 41]. Hamowanie replikacji wirusa polega na inaktywacji RNA kodującego białka wirusa, jak też ważnych dla cyklu życiowego wirusa białek komórki. Stosuje się przy tym strategię antysensu, rybozymów i wyciszania przez interferencyjny RNA. Ciekawą strategią jest blokowanie białek uczestniczących w replikacji wirusa, np. wirusowego białka tat i ludzkiej cykliny T1, przez wprowadzanie genów kodujących wewnątrzkomórkowe przeciwciała (*intrabodies*) [4]. Celem modyfikacji genetycznych są nie tylko limfocyty T czy makrofagi, ale także komórki CD34+. Wykazano nabycie oporności antywirusowej przez mysie limfocyty T, powstałe *in vivo* z przeszczepionych komórek CD34+ zawierających interferencyjny antywirusowy RNA [6]. Sam modyfikowany genom wirusa HIV-1 okazał się wyjątkowo skutecznym wektorem wobec trudnych do transdukcji komórek CD34+ [48]. Dyskutuje się też szanse na profilaktyczną szczepionkę opartą na zmodyfikowanym genomie HIV-1, którego replikacja mogłaby zachodzić tylko w obecności egzogenego związku efektorowego, np. doksycykliny [10].

PROBLEMY KONSTRUKCJI WEKTORÓW

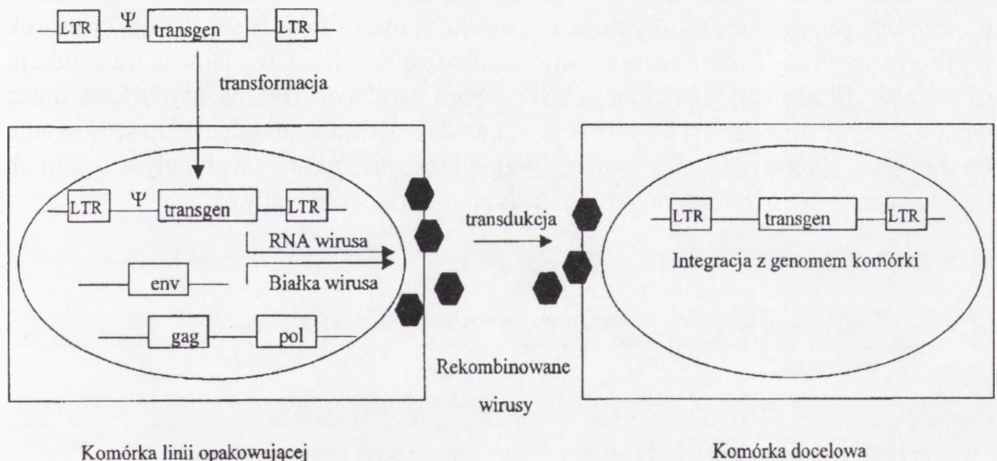
Zastosowanie terapii genowej w odniesieniu do komórek układu krwiotwórczego wymaga zarówno lepszego zrozumienia procesów komórkowych, jak też udoskonalania metod transferu genów. Metody fizykochemiczne, takie jak precypitacja z CaPO_4 , elektroporacja, techniki biobalistyczne czy mikroiniekcje, mogą powodować destrukcję znacznej części komórek i są możliwe głównie do stosowania *in vitro*. Największe zastosowanie mają nośniki (wektory) DNA konstruowane przy użyciu genomów wirusów lub związków biochemicznych.

Wektory wirusowe

Wektory wirusowe wykorzystują naturalną adaptację wirusów do infekowania komórek gospodarza (transdukcja). Wobec komórek układu krwiotwórczego testowane są wektory wywodzące się od retrowirusów, adenowirusów czy adenosatelitarnych parwowirusów (AAV) [49, 52]. Pierwszą zasadą konstruowania wektorów wirusowych jest usunięcie z wirusa, ze względów bezpieczeństwa, elementów pozwalających na autoreplikację i zastąpienie tej części genomu wprowadzanym DNA (transgenem). Wiąże się to jednak z koniecznością namnażania wirusów w liniach opakowujących, niosących brakujące geny wirusowe w plazmidach lub wirusach pomocniczych (ryc. 1). Uzyskanie wymaganego do efektywnej transdukcji miana cząstek wektora bywa

trudne. Problem też stwarzają zanieczyszczenia wirusami pomocniczymi czy innymi wirusami, np. adenowirusy zanieczyszczają preparaty AAV. Ograniczona wielkość genomów wirusowych limituje długość wprowadzanego transgenu.

Najpowszechniej wobec komórek układu krwiotwórczego stosuje się wektory onkoretrowirusowe, zbudowane na podstawie jednoniciowego genomu RNA wirusa mysiej białaczki Moloneya (MMLV). Wektor taki był użyty już w pierwszej próbie klinicznej leczenia SCID w 1990 r., a jego udoskonalanie trwa do dnia dzisiejszego [1]. Wektor tego typu pomyślnie zastosowano też wobec komórek CD34+ ze szpiku chorych na SCID, uzyskując po transplantacji długoterminową rekonstytucję funkcjonalnych, transdukowanych limfocytów T i B [28, 2]. Stosowanie wektorów onkoretrowirusowych jest jednak limitowane wydajnością transdukcji i względami bezpieczeństwa. Wektory retrowirusowe cechuje zdolność integracji z genomem gospodarza, a tym samym uzyskanie stabilnej ekspresji, ale zarazem wiąże się to z ryzykiem insercyjnej mutagenyzy i transformacji nowotworowej, gdyż miejsca integracji transgenu są przypadkowe. Znane są rzadkie przypadki indukcji białaczki spowodowanej insercyjną aktywacją protoonkogenu przez retrowirusowy wektor [33]. Dodatkowym problemem jest niezdolność onkoretrowirusów do transdukcji komórek w fazie spoczynku. Ostatnio opracowane lentiwirusowe wektory (podgrupa wektorów retrowirusowych, pochodne wirusa HIV-1) charakteryzuje m.in. zdolność transdukcji komórek dzielących się, takich jak HSC, które znajdują się w większości w fazie G_0/G_1 . Są to wektory zapewniające obecnie najbardziej wydajny transfer genów terapeutycznych do HSC, dlatego też budzą olbrzymie zainteresowanie [48, 42, 39].



RYCINA 1. Transfer genów przy użyciu wektora retrowirusowego. Wektor retrowirusowy zawiera transgen, sekwencje LTR konieczne dla transkrypcji i integracji wirusa z genomem komórki oraz sygnał kapsydacji Ψ. Wektor pozbawiony jest natomiast genów koniecznych do replikacji i genów strukturalnych (pol, gag, env). Te komplementarne geny retrowirusowe w układzie trans zawierają komórkę linii opakującej. Transgen może ulec namnożeniu i zapakowaniu w wiriony tylko po transfekcji komórek linii opakującej. Uzyskane wirusy transdukują komórki docelowe w wyniku oddziaływania ze specyficznymi receptorami na powierzchni tych komórek. Po wnikięciu do komórki, wektor integruje się z genomem w przypadkowych miejscach, co umożliwia stabilną ekspresję transgenu

Korzystna jest także możliwość uzyskania wysokiego miana przy produkcji wektora. Jednakże kwestia bezpieczeństwa stosowania tych wektorów budzi kontrowersje [8, 60].

Adenowirusy mogą infekować różnorodne komórki dzielące się. Ich dwuniciowe DNA nie integruje z genomem gospodarza, a powstały epizom łatwo podlega inaktywacji. Zminimalizowane jest zatem niebezpieczeństwo insercyjnej mutagenyzy, lecz zarazem stabilna ekspresja jest nieosiągalna. W związku z tym wektory adenowirusowe stosowane są głównie wtedy, gdy przejściowa ekspresja jest wystarczająca do uzyskania terape-utycznego efektu, takiego jak śmierć komórek nowotworowych chłoniaków, szpiczaków czy białaczek po wprowadzeniu genów „samobójczych” [50]. Próby stosowania tych wektorów wobec HSC nie są jeszcze jednoznaczne [31, 44]. Dodatkowo negatywnym czynnikiem *in vivo* jest silna immunogenność tych wektorów.

AAV to jedyne wirusy z zależną od wirusowego białka rep zdolnością do integracji w określone miejsce genomu zlokalizowane w chromosomie 19. Niestety, rekombinowane wektory tracą zdolność do specyficznej integracji. Utrudnieniem jest bardzo mała pojemność wektora typu AAV, niska wydajność jego produkcji i kwestionowana skuteczność transdukcji HSC [45].

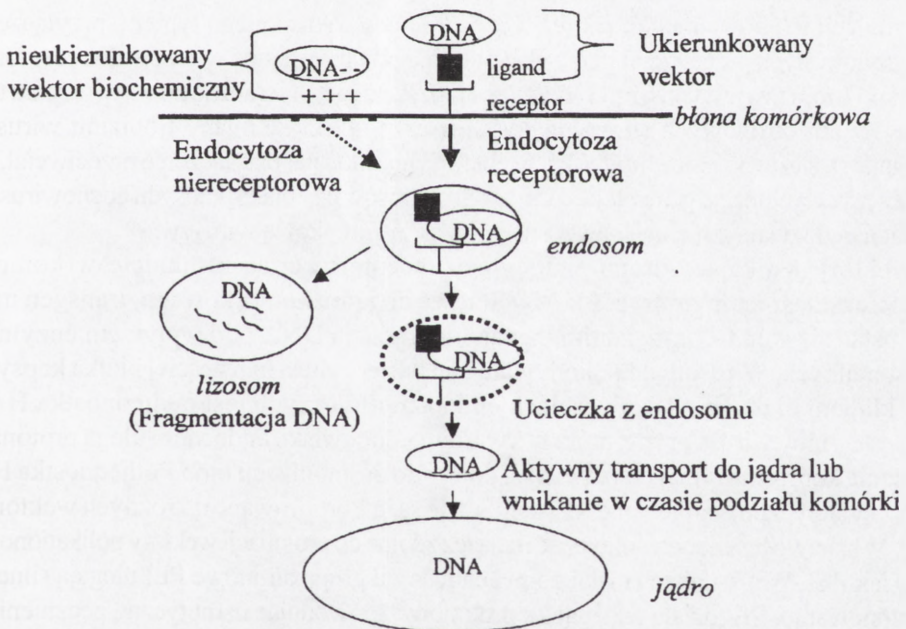
Jak widać na podstawie tego krótkiego przeglądu, każdy z obecnie dostępnych wektorów wirusowych cechują poważne ograniczenia (tab. 2). Dobór wektora zależy od licznych czynników związanych m.in. z typem docelowych komórek, typem korygowanego defektu i obraną strategią. Kryteria oceny wektorów to stopień ryzyka związany z ich wprowadzeniem do komórki, łatwość i koszt przygotowania wektora, pojemność wektora (wielkość transgeny, jaki można wprowadzić), specyficzność tkankowa, poziom immunogenności, infekcyjność wyłącznie wobec komórek proliferujących bądź także wobec komórek dzielących się, wydajność transdukcji, uzyskiwany poziom ekspresji transgeny oraz jego stabilność. Ogólnie największą zaletą wektorów wirusowych jest na ogół wysoka wydajność transdukcji, ale ich stosowanie wiąże się jednak z szeregiem zagrożeń. Względy bezpieczeństwa wpłynęły w ostatnich latach na znaczny rozwój biochemicznych metod transferu genów.

TABELA 2. Główne wady i zalety wektorów wirusowych i niewirusowych

Typ wektora	Zalety	Wady
Wektory wirusowe	Wysoka wydajność transferu genów Stabilna ekspresja transgeny (niektóre wektory)	Ryzyko insercyjnej mutagenyzy Ograniczona pojemność Immunogenność Trudności w przygotowaniu wektora
Wektory biochemiczne	Kontrolowana synteza Wysoki stopień czystości Wysoka pojemność Niska immunogenność Niższe ryzyko insercyjnej mutagenyzy	Trudność uzyskania stabilnej ekspresji transgeny Niższa wydajność transferu genów

Wektory biochemiczne

Wektory biochemiczne to głównie dwa typy związków: mieszaniny kationowych lipidów oraz polikationy. Do polikationów zaliczają się syntetyczne homopolimery aminokwasów (polilizyna, poliarginina), polisacharydy, takie jak DEAE-dekstran oraz poliaminy, np. polietylenoimina (PEI) [36, 12]. Wektory biochemiczne wiążą transgen na zasadzie elektrostatycznych oddziaływań między ujemnie naładowaną cząsteczką DNA a dodatnimi ładunkami wektora. Neutralizacja ładunku DNA powoduje jego kondensację i utworzenie zwartej struktury w kompleksie z wektorem. Kompleksy transfekcyjne utworzone przez liposomy zwane są lipopleksem (lipofekcja), zaś kompleksy polikationowe – polipleksem (polifekcja). Czasem stosuje się także lipidowo-polikationowe multipleksy. Lipopleksy czy polipleksy mogą integrować się z błoną komórkową, a następnie ulegać niereceptorowej endocytozie (ryc. 2). Stopień upakowania DNA z polikationami zależy od molowego stosunku ładunków dodatnich wektora do ujemnego ładunku grup fosforanowych DNA. Zwykle dobór tego stosunku optymalizuje się tak, aby zapewnić wypadkowy dodatni ładunek kompleksu. Sprzyja to lepszej rozpuszczalności kompleksów oraz ich łączeniu z błoną komórkową, w związku z obecnością na powierzchni wielu typów komórek ujemnie naładowanych cząsteczek proteoglikanów. Ilość kompleksowanego DNA w wektorach biochemicznych nie jest ograniczona, w przeciwieństwie do wektorów wirusowych (tab. 2). Stosowanie wektorów biochemicznych wiąże się z eliminacją pewnych zagrożeń – w standardowych dawkach są one nietoksyczne, charakteryzują się niską immunogennością, mogą być stosowane w powtórzeniach. Ich synteza przebiega w



RYCINA 2. Pokonywanie barier komórkowych w czasie transferu genów

sposób kontrolowany, mogą być otrzymywane w wysokich ilościach bez ograniczeń i bez zanieczyszczeń. Tym niemniej, na ogół przy ich zastosowaniu osiąga się niższą wydajność transfekcji i integracji. Ponadto, bez dodatkowych zmian konstrukcyjnych wektory biochemiczne nie zapewniają specyficzności tkankowej.

Ukierunkowanie wektorów i inne metody pokonywania barier komórkowych

Uzyskanie ekspresji transgenu wymaga pokonania przez wektor kilku barier komórkowych (ryc. 2). Aby zapewnić wyższą wydajność transfekcji oraz specyficzność wektorów biochemicznych wobec ściśle określonego typu komórek (ukierunkowanie), kowalencyjnie łączy się je z ligandami receptorów komórkowych [32, 55]. Wnikanie ukierunkowanego wektora do komórki opiera się wówczas na aktywacji endocytozy receptorowej, co zapewnia znacznie wyższy stopień internalizacji wektora w porównaniu z niereceptorową endocytozą wektorów nieukierunkowanych. Ukierunkowany wektor zawiera trzy elementy: 1) ligand specyficzny wobec wybranego receptora komórkowego, 2) plazmidowe DNA, 3) łącznik dwóch powyższych elementów – nieukierunkowany wektor kondensujący DNA. Receptory, wobec których najczęściej ukierunkowywano wektory biochemiczne to receptory EGF, transferyny i folianowy charakterystyczne dla wielu typów komórek nowotworowych [37, 26]. Jako ligandy stosowane są także przeciwciała, jak w przypadku immunopolipleksów ukierunkowanych wobec komórek chłoniaka [27]. Generowane są też na powierzchni komórki sztuczne receptory, takie jak cząsteczki biotyny [56]. Zastosowanie awidyny w połączeniu z czynnikiem kondensującym DNA pozwoliło na konstrukcję uniwersalnego wektora, efektywnego w komórkach linii hematopoetycznych, ukierunkowanego zarówno wobec komórek o nieznanym fenotypie po bezpośredniej biotynylacji ich powierzchni, jak też wobec komórek określonego typu po przyłączeniu biotynylowanych przeciwciał [57, 58]. Naturalne powinowactwo wirusów do receptorów komórki (tropizm) jest także modyfikowane i rozszerzane, prowadząc do wytworzenia tzw. wirusów amfotropowych (*pseudotyped viruses*) [54, 35]. Zmiany tropizmu wirusów osiągane są zarówno przez modyfikacje chemiczne, takie jak przyłączenie przeciwciał, jak też przez rekombinacje genu otoczki *env* u retrowirusów czy białek kapsydu adenowirusów. Metoda ta pozwala zmieniać nawet specyficzność gatunkową wirusów.

Wektory wnikające drogą endocytozy receptorowej są zamknięte w kompartmentie endosomalnym (ryc. 2). Aby dotrzeć do jądra komórkowego, transgen musi wydostać się z endosomu, zanim nastąpi degradacja DNA pod wpływem enzymów lizosomalnych. Wirusom do pokonywania tej bariery służą najczęściej białka kapsydu. Przykładem białka o właściwościach endoosmolitycznych jest podjednostka HA-2 hemaglutyniny wirusa grypy, która w kwaśnym środowisku endosomu ulega protonacji i zmianie konformacyjnej do α -helisy, zdolnej do destabilizacji błon. Podjednostka HA-2 oraz syntetyczne peptydy endoosmolityczne są inkorporowane do różnych wektorów [15]. Właściwości endoosmolityczne mają też zdolne do protonacji wektory polikationowe, takie jak PEI. W warunkach niskiego pH endosomu grupy aminowe PEI ulegają silnemu uprotonowaniu, PEI działa jak „gąbka protonowa” powodując osmotyczne pęcznienie, a ostatecznie rozerwanie endosomu i uwolnienie transgenu do cytoplazmy [37].

Następną barierą komórkową dla transgenu jest otoczka jądrowa. Bezpośredni dostęp do jądra możliwy jest tylko w czasie podziałów komórkowych, gdy otoczka ulega naturalnej destrukcji. Dlatego łatwiej uzyskać efektywny transfer genu w komórkach nowotworowych i intensywnie dzielących się, a dużo trudniej w nieproliferujących HSC. Strategią ułatwiającą wnikanie transgenu do jądra jest dodawanie do transgenu sekwencji sygnału lokalizacji jądrowej. Lentiwirusy mają własny aparat aktywnie transportujący je do jądra i umożliwiający transdukcję komórek dzielących się, co związane jest z wyjątkową skutecznością wektorów lentiwirusowych wobec HSC [11]. Wreszcie, po spełnieniu wymogów transportu do jądra, najtrudniejszą kwestią konstrukcji wszystkich wektorów jest zapewnienie wydajnej, kontrolowanej ekspresji transgenu oraz integracji z określonym miejscem genomu. Próby kontrolowania ekspresji wiążą się z wprowadzaniem do wektorów sekwencji tkankowo-specyficznych promotorów czy elementów indukowanych [59, 9]. Problem zapewnienia wysokiej wydajności ekspresji czy kontrolowanej insercji transgenu do genomu pozostaje nierozwiązany i wymaga dalszych intensywnych badań.

Kolejny poziom komplikacji transferu genów występuje przy systemowym podaniu wektorów do krwiobiegu. Należy wówczas wektory zabezpieczać przed szybką degradacją, oddziaływaniem z białkami surowicy krwi, erytrocytami czy innymi tkankami oraz przed wywoływaniem silnej odpowiedzi immunologicznej. W tym celu stosuje się maskowanie (*shielding*, *stealth*) wektorów przez przyłączanie takich związków, jak glikol polietylenowy czy polimery metakrylamidowe [37].

Ostatnie dziesięciolecie badań terapii genowej pokazało, że nowe możliwości terapeutyczne oparte na modyfikacjach genetycznych komórek wiążą się zarazem z nowymi trudnościami i ograniczeniami. Określenie tych trudności jest pierwszym krokiem do ich przezwyciężenia. Najważniejszym zadaniem pozostaje zagwarantowanie bezpieczeństwa stosowania terapii genowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AIUTI A. Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID. *Curr Opin Mol Ther* 2002; **4**: 515–522.
- [2] AIUTI A, SLAVIN S, AKER M, FICARA F, DEOLA S, MORTELLARO A, MORECKI S, ANDOLFI G, TABUCCI A, CARLUCCI F, MARINELLO E, CATTANEO F, VAI S, SERVIDA P, MINIER R, RONCAROLO MG, BORDIGNON C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002; **296**: 2410–2413.
- [3] ARMSTRONG AC, EATON D, EWING JC. Cellular vaccine therapy for cancer. *Expert Rev Vaccines* 2002; **3**: 303–316.
- [4] BAI J, SUI J, ZHU RY, TALLARICO AS, GENNARI F, ZHANG D, MARASCO WA. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies. *J Biol Chem* 2003; **278**: 1433–1442.
- [5] BASAK G, LASEK W. Experimental and clinical application of interleukin 12 (IL-12) Gene-based therapy in tumor treatment. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 465–486.
- [6] BANERJEE A, LI MJ, BAUER G, REMLING L, LEE NS, ROSSI J, AKKINA R. Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* 2003; **8**: 62–71.
- [7] BANERJEE D, BERTINO JR. Myeloprotection with drug-resistance genes. *Lancet Oncol* 2002; **3**: 154–158.
- [8] BAUM C, DULLMANN J, LI Z, FEHSE B, MEYER J, WILLIAMS DA, von KALLE C. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; **101**: 2099–2114.

- [9] BECKER PS. Hematopoietic stem cell gene therapy for inherited bone marrow disorders: past accomplishments and continued challenges. *J Cell Biochem Suppl* 2002; **38**: 55–64.
- [10] BERKHOUT B, VERHOEF K, MARZIO G, KLAVER B, VINK M, ZHOU X, DAS AT. Conditional virus replication as an approach to a safe live attenuated human immunodeficiency virus vaccine. *J Neurovirol* 2002; **8**: Suppl 2: 134–137.
- [11] BRENNER S, MALECH HL. Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1640**: 1–24.
- [12] BROWN MD, SCHATZLEIN AG, UCHEGBU IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm* 2000; **229**: 1–21.
- [13] CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, YATES F, de VILLARTAY JP, LE DEIST F, FISCHER A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J Gene Med* 2001; **3**: 201–206.
- [14] CHENE P. Targeting p53 in cancer. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2001; **1**: 151–161.
- [15] CHO YW, KIM JD, PARK K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J Pharm Pharmacol* 2003; **55**: 721–734.
- [16] CRADDOCK C. Haemopoietic stem-cell transplantation: recent progress and future promise. *Lancet Oncol* 2000; **1**: 227–234.
- [17] CROOP JM. Gene therapy for fanconi anemia. *Curr Hematol Rep* 2003 Jul; **2**(4): 335–340.
- [18] DELL'ÉVA R, PFEFFER U, INDRACCOLO S, ALBINI A, NOONAN D. Inhibition of tumor angiogenesis by angiostatin: from recombinant protein to gene therapy. *Endothelium*. 2002; **9**: 3–10.
- [19] De PALMA M, VENNARI MA, ROCA C, NALDINI L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2003; **9**: 789–795.
- [20] DILBER MS, GAHRTON G. Suicide gene therapy: possible applications in haematopoietic disorders. *J Intern Med* 2001; **249**: 359–367.
- [21] EMERY DW, NISHINO T, MURATA K, FRAGKOS M, STAMATOYANNOPOULOS G. Hematopoietic stem cell gene therapy. *Int J Hematol* 2002; **75**: 228–236.
- [22] FANNING G, AMADO R, SYMONDS G. Gene therapy for HIV/AIDS: the potential for a new therapeutic regimen. *J Gene Med* 2003; **5**: 645–653.
- [23] FRY JW, WOOD KJ. Gene therapy: potential applications in clinical transplantation. *Exp Rev Mol Med* 1999; **8**: <http://www-ermm.cbuc.cam.ac.uk/99000691h.htm>
- [24] FU S, LIESVELD J. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 2000; **14**: 205–218.
- [25] GALEA-LAURI J. Immunological weapons against acute myeloid leukaemia. *Immunology* 2002; **107**: 20–27.
- [26] GOSSELIN MA, LEE RJ. Folate receptor-targeted liposomes as vectors for therapeutic agents. *Biotechnol Annu Rev* 2002; **8**: 103–131.
- [27] GUILLEM VM, TORMO M, REVERT F, BENET I, GARCIA-CONDE J, CRESPO A, ALINO SF. Polyethyleneimine-based immunopolyplex for targeted gene transfer in human lymphoma cell lines. *J Gene Med* 2002; **4**: 170–182.
- [28] HACEIN-BEY-ABINA S, LE DEIST F, CARLIER F, BOUNEAUD C, HUE C, DE VILLARTAY JP, THRASHER AJ, WULFFRAAT N, SORENSEN R, DUPUIS-GIROD S, FISCHER A, DAVIES EG, KUIS W, LEIVA L, CAVAZZANA-CALVO M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1185–1193
- [29] HUANG X, LEE C. From TGF-beta to cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2003; **4**: 243–250.
- [30] HUMRICH J, JENNE L. Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003, **276**: 241–259.
- [31] JORDAN CT, VANIN EF, MARINI FC. The use of adenoviral vectors for genetic manipulation and analysis of primitive hematopoietic cells. *Curr Gene Ther* 2001; **1**: 257–265.
- [32] KATO Y, SUGIYAMA Y. Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor-mediated endocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; **14**: 287–331.
- [33] KOHN DB, SADELAIN M, GLORIOSO JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 477–488.
- [34] MAY C, RIVELLA S, CHADBURN A, SADELAIN M. Successful treatment of murine beta-thalassemia intermedia by transfer of the human beta-globin gene. *Blood* 2002; **99**: 1902–1908.
- [35] NICKLIN SA, BAKER AH. Tropism-modified adenoviral and adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2002; **2**: 273–293.
- [36] NIIDOME T, HUANG L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002; **9**: 1647–1652.
- [37] OGRIS M, WAGNER E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somatic Cell and Mol Genetics* 2002; **27**: 85–95.

- [38] PELLER S, ROTTER V. P53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum Mutat* 2003; **21**: 277–284.
- [39] PERSONS DA, NIENHUIS AW. Gene therapy for the hemoglobin disorders. *Curr Hematol Rep* 2003; **2**: 348–355.
- [40] PESCHLE C, BOTTA R, MULLER R, VALTIERI M, ZIEGLER BL. Purification and functional assay of pluripotent hematopoietic stem cells. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; **5**: 3–14.
- [41] POLURI A, MAANEN MV, SUTTON RE. Genetic therapy for HIV/AIDS. *Expert Opin Biol Ther* 2003; **3**: 951–963.
- [42] QUINONEZ R, SUTTON RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 2002; **21**: 937–951.
- [43] SADELAIN M. Globin gene transfer for the treatment of severe hemoglobinopathies: a paradigm for stem cell-based gene therapy. *J Gene Med* 2002; **4**: 113–121.
- [44] SAKURAI F, MIZUGUCHI H, HAYAKAWA T. Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Ther* 2003; **10**: 1041–1048.
- [45] SORRENTINO BP. Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 431–441.
- [46] SRIVASTAVA A. Obstacles to human hematopoietic stem cell transduction by recombinant adeno-associated virus 2 vectors. *J Cell Biochem Suppl* 2002; **38**: 39–45.
- [47] SUGIMOTO Y, TSUKAHARA S, SATO S, SUZUKI M, NUNOI H, MALECH HL, GOTTESMAN MM, TSURUO T. Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 *in vivo* from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91. *J Gene Med* 2003; **5**: 366–376.
- [48] SCHERR M, EDER M. Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 2002; **2**: 45–55.
- [49] THOMAS CE, EHRHARDT A, KAY MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; **4**: 346–358.
- [50] TURTURRO F. Recombinant adenovirus-mediated cytotoxic gene therapy of lymphoproliferative disorders: is CAR important for the vector to ride? *Gene Ther* 2003; **10**: 100–104.
- [51] Van TENDELOO VF, Van BROECKHOVEN C, BERNEMAN ZN. Gene-based cancer vaccines: an *ex vivo* approach. *Leukemia* 2001; **15**: 545–558.
- [52] Van TENDELOO VF, Van BROECKHOVEN C, BERNEMAN ZN. Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells. *Leukemia* 2001; **15**: 523–544.
- [53] WILDA M, FUCHS U, WOSSMANN W, BORKHARDT A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002; **21**: 5716–5724.
- [54] WILLIAMS DA, NIENHUIS AW, HAWLEY RG, SMITH FO. Gene Therapy 2000. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2000; 376–393.
- [55] WICKHAM TJ. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nat Med* 2003; **9**: 135–139.
- [56] WOJDA U, GOLDSMITH P, MILLER JL. Surface membrane biotinylation efficiently mediates the endocytosis of avidin bioconjugates into nucleated cells. *Bioconjug Chem* 1999; **10**: 1044–1050.
- [57] WOJDA U, MILLER JL. Targeted transfer of polyethylenimine-avidin-DNA bioconjugates to hematopoietic cells using biotinylated monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 2000; **89**: 674–681.
- [58] WOJDA U, MILLER JL. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are not required for crosslinking-mediated endocytosis or transfection of avidin bioconjugates into biotinylated cells. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1467**: 144–149.
- [59] WOODS NB, OOKA A, KARLSSON S. Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Leukemia* 2002; **16**: 563–569.
- [60] WOODS NB, MUESSIG A, SCHMIDT M, FLYGARE J, OLSSON K, SALMON P, TRONO D, von KALLE C, KARLSSON S. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 2003; **101**: 1284–1289.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 05.11.2003 r.

Przyjęto: 30.01.2004 r.

The first part of the paper deals with the general principles of the theory of the evolution of the human mind. It is shown that the human mind is not a static entity, but a dynamic one, which is constantly changing and developing. The author discusses the various factors which influence the development of the human mind, such as the environment, the social conditions, and the individual characteristics of the person. It is argued that the human mind is a product of its environment, and that it is constantly being shaped and reshaped by the social conditions in which it lives. The author also discusses the role of the individual in the development of the human mind, and how the individual's characteristics and experiences influence the way in which the mind develops. The second part of the paper deals with the application of these principles to the study of the human mind. It is shown that the human mind is a complex and multifaceted entity, and that it is not possible to understand it fully without taking into account all of these factors. The author discusses the various methods which have been used to study the human mind, and how these methods have been influenced by the theory of the evolution of the human mind. It is argued that the most effective way to study the human mind is to use a combination of these methods, and to take into account all of the factors which influence its development. The third part of the paper deals with the implications of the theory of the evolution of the human mind for the study of the human mind. It is shown that the theory of the evolution of the human mind has important implications for the study of the human mind, and that it is essential to take these implications into account when studying the human mind. The author discusses the various implications of the theory of the evolution of the human mind, and how these implications have influenced the study of the human mind. It is argued that the theory of the evolution of the human mind is a fundamental theory, and that it is essential to understand it fully if we are to understand the human mind.

KOMPLEKS SYGNALNY COP9 I JEGO ROLA W REGULACJI STABILNOŚCI BIAŁEK EUKARIOTÓW

THE COP9 SIGNALOSOME AND ITS ROLE IN REGULATION PROTEIN STABILITY IN EUKARYOTES

Paulina NOWAKOWSKA, Waldemar WOJCIECHOWSKI, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Uniwersytet Mikołaja Kopernika,
Toruń

Streszczenie: Kompleks sygnałowy COP9 (*CO*nstitutive *Pho*tomorphogenic 9) określane coraz częściej skrótem CSN (ang. *COP9 signalosome*) jest wielopodjednostkowym kompleksem jądrowym występującym powszechnie u *Eukariotów*. Wyniki wielu różnorodnych badań wykazały udział CSN w szerokim spektrum procesów życiowych, takich jak: fotomorfogeneza, regulacja cyklu komórkowego czy różnicowanie komórek. Coraz częściej kompleks sygnałowy COP9 wiązany jest z kontrolą, zależnej od ubiquityny, degradacji białek. Wnioski takie formułuje się na podstawie współdziałania tego kompleksu z trzema ligazami ubiquitynowymi: SCF (*SKP1*, *Cullin/CDC53*, *F-BOX*), MDM2 (*Murine Duble Minute 2*), COP1 (*CO*nstitutive *Pho*tomorphogenic 1). Opisanymi dodatkowo przejawami aktywności CSN są fosforylacja białek (choć nie bezpośrednio) oraz odłączanie białka NEDD8 (*Neural precursor cell-Expressed Developmentally Down-regulated 8*) (denedylacja), które to procesy mogą wpływać na stabilność białek współdziałających z kompleksem CSN. Dodatkowo postuluje się jego udział w transporcie ubiquitynowanych białek z jądra do cytoplazmy i kierowaniu ich do degradacji w proteasomie 26S. CSN tworzy osiem podjednostek, z których dwie zawierają domenę MPN (*Mpr1*, *Pad1p*, *N-koniec*), a pozostałe domenę PCI (*Proteasom*, *Cop9*, *eIF3*). Ta ostatnia jest także elementem charakterystycznym dla dwóch innych wielopodjednostkowych białek, takich jak proteasom 26S i czynnik inicjacji translacji eIF3. Fakt ten, jak również inne opisane w artykule spostrzeżenia, sugerują współdziałanie tych trzech kompleksów w wielopoziomowej kontroli stabilności białek.

Słowa kluczowe: kompleks sygnałowy COP9, proteoliza, ligaza ubiquitynowa.

Summary: The COP9 signalosome (*CO*nstitutive *Pho*tomorphogenic 9) (called often CSN) is a multi-protein, nuclear complex existing commonly in *Eucariotes*. Numerous studies have shown that the CSN is engaged in many processes such as photomorphogenesis, cell cycle control and differentiation. The CSN is implicated in ubiquitin mediated protein degradation and recently have been shown to interact with three ubiquitin ligases: SCF (*SKP1*, *Cullin/CDC53*, *F-BOX*), MDM2 (*Murine Duble Minute 2*), COP1 (*CO*nstitutive *Pho*tomorphogenic 1). Two activities associated with the CSN have been identified so far: a protein kinase and NEDD8 (*Neural precursor cell-Expressed Developmentally Down-regulated 8*) deconjugation (denedylation) that may determine stability of CSN interacting proteins. Additionally, the CSN appears to be involved in cellular transport of ubiquitinated proteins from

the nucleus into the cytosol and triggers their degradation by the 26S proteasome. The CSN is built by 8 subunits. Two of them contain the MPN (*Mpr1*, *Pad1p*, *N-end*) domain, the rest contain PCI domain. PCI (*Proteasom*, *Cop9*, *eIF3*) domain is a characteristic element of two another multiprotein complexes: 26S proteasome and eIF3. These facts suggest that these three complexes may be involved in multiple control of protein stability.

Key words: COP9 signalosome, ubiquitin ligases, protein degradation.

WPROWADZENIE

Kompleks CSN (*COP9 Signalosome*) został zidentyfikowany po raz pierwszy podczas genetycznej analizy mutantów *Arabidopsis thaliana* [67]. Mutacje w jedenastu plejotropowych loci *COP/DET/FUS* (*CO*nstitutive *Pho*tomorphogenic / *De-ET*iolated / *FUS*ca) powodowały wystąpienie konstytutywnej fotomorfogenezy bez względu na warunki wzrostu roślin [20]. Fenotypowo przejawiało się to u tych roślin, na poziomie morfologicznym (otwarte liścienie, zahamowanie elongacji hypocotyła), cytologicznym (rozwój chloroplastów), biochemicznym (akumulacja antocyjanów), a także genetycznym (aktywacja ekspresji genów indukowanych światłem). Wszystkie opisane loci podzielono na dwie grupy. Pierwsza składa się z ośmiu genów (m.in. *FUS6*, *COP8*, *FUS5*, *COP9*), których mutacje powodują utratę 450–550 kDa kompleksu białkowego, pozostałe trzy *DET1*, *COP1*, *COP10* nie wykazują powyższego efektu [20, 30]. Dalsze prace pozwoliły w 1994 roku wyizolować 23 kDa białko nazwane COP9. Dzięki dokładniejszym analizom stwierdzono, że jest to część kompleksu białkowego, który nazwano kompleksem sygnałowym COP9, oznaczanym obecnie skrótem CSN [10].

Nie stwierdzono występowania CSN u organizmów prokariotycznych, a pojawia się on dopiero w komórkach eukariotycznych [20, 34]. Występuje on w większości badanych gatunków, takich jak: *Schizosaccharomyces pombe* [66], *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* [16], a także w wielu gatunkach roślin wyższych [67] i ssaków [6, 67]. U *Saccharomyces cerevisiae* stwierdzono początkowo istnienie homologa tylko podjednostki piątej CSN, jednakże ostatnie doniesienia wskazują na obecność w nich kompleksu podobnego do CSN, lecz zbudowanego z mniejszej ilości podjednostek [40].

Badania nad rolą kompleksu CSN wykazały jego udział w wielu kluczowych procesach życiowych. Pierwszym opisanym była represja w ciemności fotomorfogenezy siewki, czyli wzrostu roślin charakterystycznego dla warunków świetlnych. Odbywa się to przez degradację pozytywnego regulatora tego procesu, białka HY5 (*long HY*pocotyl 5), przy udziale białka COP1 jako ligazy ubikwitynowej [47].

Wiedza o działaniu CSN u innych eukariotów jest mniej precyzyjna. Jednakże wykazano, że u *S. pombe* pełni on funkcję czynnika wpływającego na cykl komórkowy [43], a mutanty *csn* charakteryzują się wolniejszym wzrostem i wyższą wrażliwością na promieniowanie UV [71]. Badania homologa podjednostki CSN5, a także podjednostek tworzących kompleks podobny do CSN u *S. cerevisiae* dowiodły zaangażowania odpowiedników CSN5, CSN9 i CSN12 w kontrolę procesu odpowiedzi

na feromony komórek haploidalnych drożdży. Odbywa się to najprawdopodobniej poprzez hamowanie uruchamianej przez feromony kaskady kinaz MAP [41]. Genetyczne analizy mutantów *csn Drosophila melanogaster* wykazały, że obecność tego kompleksu jest konieczna dla przejścia stadium larwy [16]. Dodatkowo zaangażowanie w komórkach ssaków CSN w ochronę czynnika transkrypcyjnego c-JUN przed degradacją potwierdzają istotność tego kompleksu w rozwoju organizmów zwierzęcych [4, 44]. Postulowanym mechanizmem działania kompleksu CSN jest regulacja stabilności specyficznych białek m.in. regulatorów cyklu komórkowego i czynników transkrypcyjnych przez kontrolę zależnej od ubikwityny proteolizy [2, 3, 70].

Znaczenie kompleksu sygnalnego dla procesów życiowych podkreśla fakt, iż mutacje w którymkolwiek z genów kodujących podjednostki CSN powodują śmierć w późnym stadium siewki [49], a muszki owocowej w późnym stadium larwy [11, 16, 45, 48]. Natomiast obniżenie ilości kompleksu sygnalnego w komórkach roślin transgenicznych *A. thaliana*, przez wprowadzenie genu kodującego mRNA podjednostki szóstej w orientacji antysensownej powodowało wydłużenie życia roślin. Wykazywały one jednak wiele defektów rozwojowych, takich jak: utrata symetrii, fuzja organów, sterylne kwiaty oraz upośledzona reakcja na auksyny [49]. Jak dowiedziono, ostatni z wymienionych efektów jest związany z udziałem CSN w degradacji białka IAA/AUX, represora transkrypcji genów odpowiedzi na auksyny [7]. Mutanty *csn Arabidopsis* nie są zdolne do prowadzenia degradacji białka represorowego i w konsekwencji rośliny nie wykazują fototropizmu czy dominacji wierzchołkowej [51, 52]. U *C. elegans* wyciszenie podjednostki CSN5 za pomocą RNAi powoduje sterylność nicieni (małe gonady bez oocytów), lecz nie wpływa na inne funkcje życiowe [58].

Badania *in vitro* i *in vivo* pozwoliły zidentyfikować wiele białek współdziałających z poszczególnymi podjednostkami, a ich wykaz przedstawiono w tabeli 2. Są to w głównej mierze czynniki transkrypcyjne oraz białka zaangażowane w regulację cyklu komórkowego i procesów różnicowania.

Fakt, że mutanty *csn A. thaliana* akumulują białka multiubikwitynowane sugeruje udział tego kompleksu w proteolizie [3]. Dodatkowo, jego rola w procesie fotomorfogenezy czy w reakcjach odpowiedzi na fitohormony (*A. thaliana*) i feromony (*S. cerevisiae*) nadaje temu kompleksowi wyjątkowego charakteru, elementu łączącego szlaki transdukcji sygnałów w komórce z zależną od ubikwityny degradacją białek.

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA KOMPLEKSU CSN

Kompleksy CSN izolowane z komórek *A. thaliana*, kalafiora i ssaków złożone są z ośmiu podjednostek o masach cząsteczkowych od 22 do 50 kDa [17]. W 2000 roku Deng i in. [10] ujednolicił nazewnictwo podjednostek (bardzo różnorodny do tego czasu) szeregując je od największej CSN1 do najmniejszej CSN8 [10]. Zestawienie nazw poszczególnych podjednostek używanych w przeszłości przedstawiono w tabeli 1.

Kompletny, złożony z 8 podjednostek kompleks CSN lokalizowany jest na terenie jądra [35]. Część podjednostek CSN może jednak występować również w formie

TABELA 1. Podsumowanie wcześniejszej i obecnej nomenklatury podjednostek sygnałsomu COP9 (za [9] zmodyfikowane)

Nowe nazewnictwo	Nazewnictwo oryginalne			
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Człowiek	Mysz	<i>Drosophila melanogaster</i>
CSN1	COP11, FUS6	Sgn1, GPS1	COPS1, Mfh	DCH1
CSN2	Podjednostka2	Sgn2, TRIP15, hAlien	COPS2	DCH2, Alien
CSN3	FUS11	Sgn3	COPS3	DCH3
CSN4	COP8, FUS4	Sgn4	COPS4	DCH4
CSN5	AJH1, AJH2	Sgn5, JAB1	COPS5, Jab1	DCH5
CSN6	Podjednostka 6	Sgn6, hYIP	COPS6	DCH6
CSN7	COP15/FUS5	Sgn7	COPS7a, COPS7b	DCH7
CSN8	COP9/FUS7	Sgn8, hCOP9	COPS8	DCH8

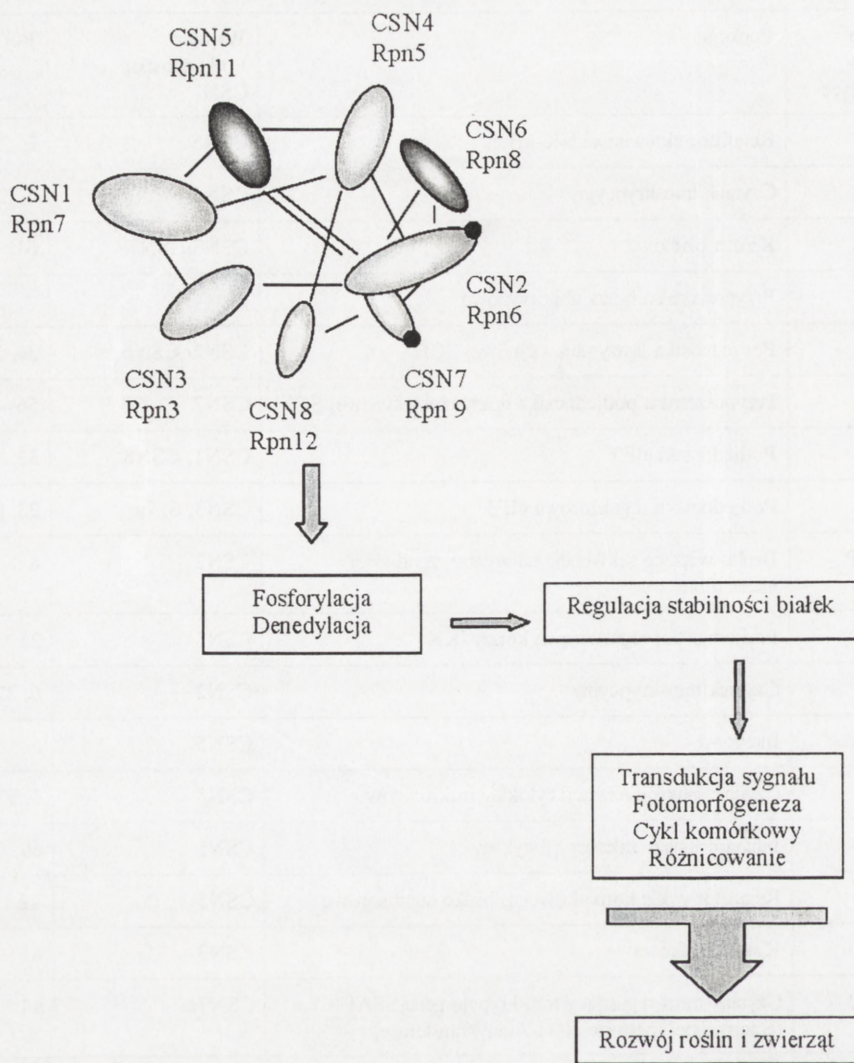
monomerycznej poza jądrem. Ma to miejsce w przypadku CSN5 [6, 30, 35, 56] i CSN7 [30, 31, 32, 56]. Podjednostka CSN5, jako monomer, spotykana jest głównie na terenie cytoplazmy i co ciekawe u mutantów *A. thaliana cop1* i *det1* CSN5 w tej formie nie jest odnajdywany [35]. Znaczenie tak zróżnicowanej lokalizacji podjednostek nie zostało dotychczas wyjaśnione. Sugeruje się, że może mieć to związek z samodzielną aktywnością podjednostek, mogących występować w formie niezwiązanej z kompleksem CSN [30].

Analiza sekwencji aminokwasowych podjednostek CSN pozwoliła wyodrębnić dwa charakterystyczne elementy. Pierwszy występuje w sześciu podjednostkach (CSN 1–4, 7, 8). Jest to C-końcowa domena utworzona przez około 200 aminokwasów o strukturze wielo-alfa-helikalne, w której połowa położona bliżej końca C jest bardziej konserwowana [24]. Nazwano ten element PCI od nazw kompleksów białkowych, w podjednostkach których występuje (Proteasom, Cop9, eIF3). Element ten nie ma aktywności katalitycznej, a jego występowanie tylko w białkach budujących wielopodjednostkowe kompleksy sugeruje, że uczestniczy on w tworzeniu i utrzymywaniu struktur kompleksu. Dowodem na to może być również fakt, że delekcja tej domeny w podjednostce CSN4 [31, 57] lub CSN1 [61, 64] uniemożliwia formowanie się kompleksu CSN. Drugi element, obecny w pozostałych dwóch podjednostkach to MPN (Mpr1, Pad1p, N-końiec), który tworzony jest od strony N-końca białka przez ok. 140 aminokwasów przybierając strukturę alfa - beta [24]. Funkcja tej domeny nie jest znana. Jej obecność w podjednostce CSN5, mającej najwięcej zidentyfikowanych białek współdziałających spośród składników kompleksu (tab. 2) może sugerować udział tej domeny w oddziaływaniach z substratami CSN. Jednakże hipotezy tej nie potwierdzają badania podjednostki CSN2. Pomimo że jest ona drugą co do ilości zidentyfikowanych białek współdziałających to nie ma domeny MPN.

Porównanie genów kodujących podjednostki CSN *A. thaliana* i człowieka oraz wieczka proteasomu 26S *A. thaliana* wykazało znaczące podobieństwo między tymi kompleksami, każda podjednostka CSN ma swojego paraloga w wieczku proteasomu

TABELA 2. Charakterystyka białek związanych z kompleksem sygnałnym CSN

Białko współdziałające	Funkcja	Wiążąca Podjednostka CSN	Ref.
Bcl-3	Regulator aktywności NK-kB	CSN5	3, 53
c-Jun	Czynnik transkrypcyjny	CSN5	6, 22, 42
CK2	Kinaza białkowa	CSN3/CSN7	61
COP1	Przypuszczalna ligaza ubikwitynowa	?	
Cull1	Podjednostka ligazy ubikwitynowej SCF	CSN2/ CSN6	26, 27, 38
Cul3	Przypuszczalna podjednostka ligazy ubikwitynowej SCF	CSN2	56
eIF3c	Podjednostki eIF3	CSN1, CSN8	32
eIF3e	Podjednostka regulatorowa eIF3	CSN3, 6, 7a	23, 69
ICSBP	Białko wiążące sekwencje najwyższej zgodności interferonu	CSN2	8
IKK γ	Podjednostka regulatorowa kinazy IKK	CSN3	25
Jun D	Czynnik transkrypcyjny	CSN2	6, 22, 42
LFA-1	Integryna	CSN5	5
MIF	Czynnik inhibicji migracji cytokiny makrofażów	CSN5	3, 53
p27	Inhibitor kinazy zależnej od cykliny	CSN5	60, 70
p53	Regulator cyklu komórkowego, białko supresorowe	CSN5	42
PKD	Kinaza białkowa	CSN3	61
PMF-1	Czynnik trans regulujący transkrypcję genu SSAT (Spermidine/Spermine N(1)-Acetyltransferase)	CSN7a	64
PR	Receptor progesteronu	CSN5	47
rLHR	Prekursor receptora lutropiny/chondrogonadotropiny	CSN5	3, 53
Rpn6/AtS9	Podjednostka wieżka proteasomu 26S	CSN1/CSN2/CSN7	33, 37, 53
SCR-1	Koaktywator receptora steroidowego	CSN5	53
THR	Receptor hormonu tyreoidowego	CSN2	9
VPR	Białko HIV1	CSN6	39



RYCINA 1. Schemat struktury podjednostkowej kompleksu sygnałowego COP9 (CSN), ortologów w wieczku proteosomu 26S (Rpn) oraz procesy, w których bierze udział CSN (za [3] zmodyfikowane)

[15]. Proteasom 26S to około 2 MDa wielopodjednostkowy kompleks tworzący zależną od ATP proteazę, która zajmuje się nie lizosomową degradacją białek w komórkach eukariotycznych [15]. Składa się on z rdzenia w postaci cylindra 20S zamykanego z każdej strony przez część regulatorową 19S, zbudowaną z kolei z części bazowej i wieczka. Wieczko jest 400 kDa kompleksem pełniącym prawdopodobnie funkcję w procesie rozpoznawania ubikwitynowych substratów, odłączania od nich ubikwityny i kierowania białka do degradacji w kolejnych częściach proteasomu [7, 20]. Porównanie

budowy wieczka proteasomu 26S i CSN izolowanych z erytrocytów człowieka, za pomocą mikroskopu elektronowego 2D wskazuje, że aczkolwiek nie są to kompleksy identyczne, to jednak można wyróżnić kilka cech wspólnych takich jak podobna wielkość, aranżacja podjednostek, asymetria i występowanie centralnego rowka (ryc.1) [3, 28].

UDZIAŁ CSN W REGULACJI DEGRADACJI BIAŁEK ZALEŻNEJ OD UBIKWITYNY

Szereg przeprowadzonych obserwacji sugeruje związek kompleksu sygnałnego COP9 z procesami proteolizy. Jednym z ważniejszych jest współdziałanie CSN z ligazami ubikwitynowymi, enzymami biorącymi udział w procesie wiązania ubikwityny z białkami, które mają ulec degradacji. Opisano powiązanie CSN z trzema enzymami tego typu, a mianowicie: SCF, COP1, MDM2. Proces proteolizy został już wielokrotnie przedstawiony w polskiej literaturze [19, 68], stąd w niniejszym opracowaniu znajduje się tylko charakterystyka elementów szlaku degradacji białek związanych z kompleksem CSN.

Współdziałanie CSN z ligazą ubikwityny typu SCF

SCF ligazy są jednym z typów ligaz ubikwityny, które zostały znalezione u wszystkich dotychczas badanych Eukariotów. Każda z nich zbudowana jest z czterech podjednostek:

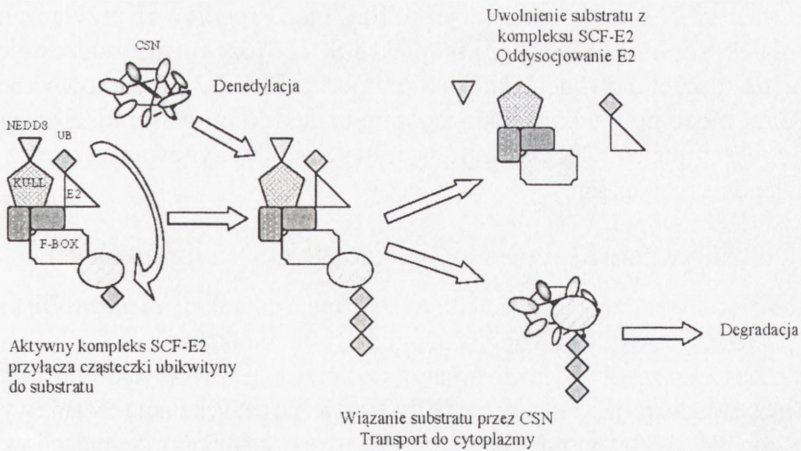
- 1 SKP1 (**S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1**),
- 2 Kullin/CDC53 (**CELL DIVISION CYCLE 53**),
- 3 F-BOX,
- 4 RBX1/HRT1/ROC1 (**RING BOX PROTEIN 1 / HIGH-LEVEL EXPRESSION REDUCES TY3 TRANSPOSITION 1 / REGULATOR OF CULLINS 1**) [12].

W ligazie SCF na stałe obecne i tworzące rdzeń enzymu są podjednostki RBX1 i kullina, a F-BOX i SKP1 są wymienne. Za specyficzność substratową odpowiedzialna jest podjednostka F-BOX. Białko RBX1 jest odpowiedzialne za wiązanie enzymu E2 (enzym łączący się z zaktywowaną ubikwityną), natomiast SKP1 pełni funkcję strukturalną [7]. Podjednostkę F-BOX tworzą białka mające 40-aminokwasową domenę F-BOX odpowiedzialną za wiązanie białek, po raz pierwszy opisaną w cyklinie F (stąd nazwa domeny) [19]. Kullina stanowi podjednostkę regulatorową, której modyfikacje (przez przyłączenie i odłączenie białka NEDD8) regulują aktywność całego kompleksu enzymu [38]. Prace prowadzone w celu identyfikacji białek współdziałających z hCUL1 (kullina pochodzenia ludzkiego) wykazały jej fizyczne interakcje z CSN [38]. CSN wiążąc podjednostkę rdzeniową kullinę może współdziałać z ligazami zawierającymi różne białka z domeną F-BOX czy też SKP1 i w konsekwencji uczestniczyć w degradacji różnych substratów [53].

Prowadzone na roślinach badania dotyczące interakcji między ligazami ubikwitynowymi a CSN wykazały powiązanie kompleksu sygnałnego i ligazy SCF z procesem odpowiedzi roślin na auksyny [12, 51], fitohormony pełniące ważną rolę we wzroście i rozwoju rośliny. Aktywność rodziny genów transkrypcyjnych inhibitorów białek AUX/IAA (*AUXin / Indole Acetic Acid*) u *Arabidopsis* jest gwałtownie indukowana przez te fitohormony. Uważa się, że białka AUX/IAA, przy braku auksyn, hamują swoją własną transkrypcję przez sprzężenie zwrotne. Ta represja na poziomie transkrypcji odwracana jest w obecności fitohormonów dzięki degradacji białek represorowych AUX/IAA [52, 53]. Badania genetyczne wykazały, że przynajmniej część białek AUX/IAA jest ubikwitynowana i w ten sposób kierowana na drogę degradacji przez ligazę SCF^{TIR1} (TIR1, *Transport Inhibitor Response 1*) [51]. Dokładniejsze analizy wykazały oddziaływania między SCF^{TIR1}, a CSN. Co ciekawe, mutanty podjednostek kulliny i RBX1 też ligazy wykazują ograniczony rozwój korzeni bocznych i elongację włókników, co czyni je częściowo podobnymi fenotypowo do mutantów z upośledzoną funkcją CSN. Ponadto, u mutantów CSN, indukcja auksynami genów *AUX/IAA* oraz poziom degradacji produktów ich ekspresji jest obniżony [53].

Postuluje się, że mechanizmem regulacji ligazy SCF przez kompleks CSN może być denedylacja, czyli odłączania białka NEDD8/RUB1 (*Neural precursor cell-Expressed Developmentally Down-regulated 8 / Related to UBiquitin1*) od kulliny stanowiącej podjednostkę ligazy SCF [38]. NEDD8/RUB1 to małe, podobne do ubikwityny białko (50–60% podobieństwa na poziomie aminokwasowym) występujące u Eukariotów [36, 42, 53], którego przyłączenie do białka docelowego odbywa się podobnie jak wiązanie ubikwityny [51]. Jedynym dotychczas zidentyfikowanym białkiem podlegającym modyfikacji przez NEDD8 jest podjednostka kulliny ligazy SCF [26]. W komórkach *Arabidopsis* typu dzikiego występują dwie pule kulliny, niemodyfikowana oraz nedylowana, to znaczy z przyłączonym białkiem NEDD8. Komórki z mutacją *csn* kumulują zmodyfikowaną kullinę, a oczyszczony kompleks sygnałny ma *in vitro* zdolność denedylacji tego białka. Zdolność tę ma podjednostka CSN5 zawierająca domenę Cys-box charakterystyczną dla enzymów deubikwitynujących. Mutant homologa CSN5 *S. cerevisiae* (YDL216C) również charakteryzuje się zaburzonym procesem odłączania NEDD8 [38]. Jednakże doświadczenia prowadzone na *Arabidopsis thaliana* wykazały, że mutanty *csn* w innych podjednostkach niż CSN5, prowadzące do utraty całego kompleksu sygnałnego, a mające monomeryczne formy CSN5, tracą zdolność denedylacji i akumulują nedylowaną kullinę [54]. Na tej podstawie można wnioskować, że nie tylko piąta podjednostka jest potrzebna do przeprowadzenia denedylacji, lecz niezbędny wydaje się być cały kompleks.

Nedylacja ligazy SCF promuje jej aktywność oraz wspomaga efektywne wiązanie enzymu przenoszącego ubikwitynę E2. Odłączenie białka NEDD8 powoduje oddysocjowanie E2, zaprzestanie ubikwitynacji i uwolnienie substratu [33]. Dodatkowo badania *S. pombe* i komórek człowieka pokazują, że białko F-BOX wiąże się chętniej ze zmodyfikowaną kulliną [53, 71]. Mutanty *csn* akumulują poliubikwitynowane białka, które nie są jednak degradowane. Podsumowując, można sugerować udział kompleksu CSN w uwalnianiu substratu z kompleksu SCF-E2 (przez denedylację kulliny) lub też,



RYCINA 2. Udział CSN w regulacji degradacji białek przez odłączenie białka NEDD8 od kompleksu SCF-E2 (szczegóły w tekście)

jak sugeruje Kepinski i Leyser [33], w transporcie białek z przyłączoną ubikwityną na teren cytoplazmy do proteasomu (ryc. 2).

Innym przykładem współdziałania CSN i ligazy ubikwitynowej SCF jest kontrola degradacji białka p27. Białko to funkcjonuje jako inhibitor kinaz cyklino-zależnych i w konsekwencji procesów proliferacji, a spadek jego ilości powoduje niekontrolowane namnażanie komórek i często prowadzi do nowotworzenia [60, 70]. Yang i współpracownicy [70] sugerują, że CSN hamuje jego proteolizę przez denedylację podjednostki kulliny w kompleksie ligazy SCF pośredniczącej w przyłączaniu ubikwityny do p27. Natomiast Tomoda i in. [60] uważają, że mechanizm stabilności białka p27 wiąże się z regulacją transportu tego białka związanego z podjednostką CSN5 do cytoplazmy.

U *A. thaliana* stwierdzono również współdziałanie kompleksu sygnałnego z dwiema innymi ligazami SCF: SCF^{COI1} oraz SCF^{UFO}. COI1 (*CO*ronatine *I*nensitive *1*) i UFO (*U*nusual *F*loral *O*rgans) są to białka zawierające domenę F-box, zdolne do formowania kompleksu ligazy typu SCF [7, 63]. SCF^{COI1} bierze udział w procesie odpowiedzi na kwas jasmonowy, fitohormon zaangażowany w reakcje obronne oraz rozwój pręcików i pyłku [13, 14]. Natomiast SCF^{UFO} wiąże kompleks CSN z rozwojem kwiatów [63].

Do niedawna denedylacja uznawana była za sposób negatywnej regulacji aktywności ligazy SCF [53]. Ta hipoteza sugerowała, że nedyllacja i denedylacja funkcjonują w sposób antagonistyczny. Jednakże, ostatnie badania fizjologiczne na roślinach sugerują, że oba te procesy współdziałają w kontroli degradacji białek [54]. Procesy te regulują interakcje między podjednostkami ligazy oraz przyłączenie enzymu E2, a także uwalnianie substratu. Istnieją dowody, że oba te procesy nie wpływają na przyłączenie kulliny do kompleksu SCF, ani SCF do CSN [46]. Pomimo to mogą jednak wpływać na kontrolę asocjacji podjednostki F-BOX do reszty kompleksu ligazy związanej już z

CSN. Tak więc CSN przez denedylację kulliny może regulować przyłączanie lub usuwanie białek z domeną F-BOX z kompleksu SCF. Może również uczestniczyć w uwalnianiu już ubikwitynowanego białka z kompleksu SCF-E2. Dodatkowo kompleks sygnałny CSN może brać udział w transporcie białek do proteasomu. Szczegółowe określenie roli kompleksu CSN w degradacji białek ubikwitynowanych przez ligazy SCF wymaga dalszych badań.

Oddziaływanie Kompleksu Sygnałnego CSN z ligazą COP1

Pomimo że nie stwierdzono bezpośrednio fizycznych interakcji między COP1 a CSN, to istnieją pośrednie dowody oddziaływań między tymi białkami.

Mutanty genu *COP1* zostały zidentyfikowane w czasie analiz genetycznych roślin *Arabidopsis* mających fenotyp podobny jak mutanty *csn* [20]. Genetyczne i molekularne badania wykazały, że COP1 i kompleks CSN są niezbędne do zależnej od ciemności degradacji czynnika transkrypcyjnego HY5 stanowiącego pozytywny regulator procesów fotomorfogenezy [47].

Białko COP1 zawiera trzy domeny: WD40, COILED COIL oraz RING FINGER [21]. Domeny WD40 i RING FINGER są charakterystyczne dla ligaz ubikwitynowych jak na przykład c-Cbl [53]. Porównując dane wynikające z prac nad rolą COP1 w degradacji HY5 i jego strukturą pozwala przypuszczać, że białko to prawdopodobnie funkcjonuje jako ligaza ubikwitynowa [12]. Potwierdzają to doświadczenia Bianchi i in. [4], którzy wykazali zdolność białka COP1 do ubikwitynizacji *in vitro* białek c-JUN i JUN D.

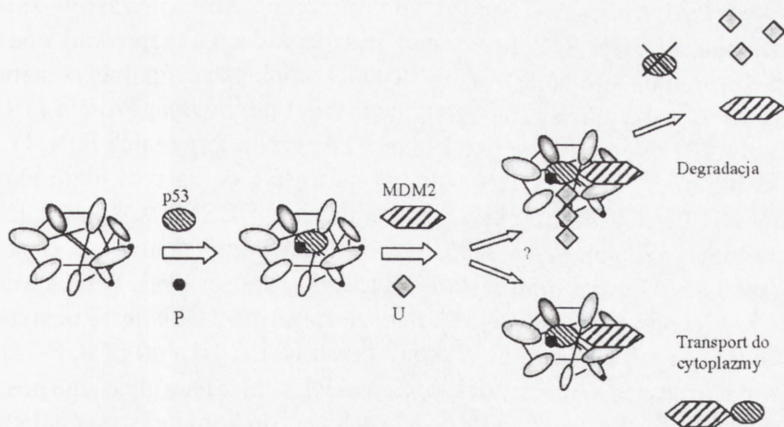
W ciemności białko COP1 jest akumulowane w jądrze komórkowym, w którym jest odpowiedzialne za degradację HY5. W komórkach roślin *A.thaliana* wystawionych na światło białko COP1 jest lokalizowane w cytoplazmie, a funkcjonalne białko HY5 odnajdywane jest w jądrze [21]. Szczegółowy mechanizm, który reguluje wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie COP1, nie jest znany, lecz u mutantów *csn* białko to jest odnajdywane w cytoplazmie również wówczas, gdy rośliny są w ciemności. Może to sugerować udział CSN we właściwej lokalizacji komórkowej białka COP1 [53].

Dodatkowym elementem łączącym kompleks CSN z ligazą COP1 jest białko COP10 działające jako enzym E2. Ostatnie doniesienia wykazują zdolność COP10 do bezpośredniego wiązania w systemie dwuhybrydowym w komórkach drożdży zarówno COP1, jak i CSN można więc postulować wspólny udział tych trzech białek regulacji procesu fotomorfogenezy [59].

Oddziaływanie Kompleksu Sygnałnego CSN z ligazą MDM2

Współdziałanie MDM2 i CSN jest słabo poznane, a o ich powiązaniu można wnioskować na podstawie udziału obu kompleksów w kontroli degradacji białka p53.

Ligaza ubikwitynowa MDM2 reguluje funkcje białka p53 przez blokowanie jego aktywności transkrypcyjnej, eksport tego białka z jądra do cytoplazmy oraz promowanie jego degradacji. MDM2 ma zdolność zarówno do autoubikwitynacji, jak i modyfikacji między innymi takich substratów jak p53. Równowaga między obydwojema procesami jest modulowana przez potranslacyjne modyfikacje ligazy MDM2, takie jak fosforylacja czy sumoizacja, czyli przyłączania białka SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifier*) należącego do białek podobnych do ubikwityny [18].



RYCINA 3. Schemat udziału kompleksu sygnalnego CSN i ligazy ubikwityny MDM2 w regulacji degradacji i/lub lokalizacji komórkowej białka p53 (za [3] zmodyfikowane)

W strukturze białka MDM2 wyróżniono dwa elementy umiejscowienia subkomórkowego: sygnał lokalizacji jądrowej oraz sygnał lokalizacji cytoplazmatycznej. Pozwala to na zmiany rozmieszczenia tego białka. Przyłączenie p53 do ligazy MDM2 powoduje przemieszczenie kompleksu p53-MDM2 do cytoplazmy. Ufosforylowanie p53, w którym prawdopodobnie pośredniczy CSN, zwiększa zdolność wiązania tego białka z MDM2. Konsekwencją tych zmian może być transport p53 do cytoplazmy i/lub jego degradacja [1]. Na przykładzie degradacji tego białka, Bech-Otschir i in. [2, 3] sugerują następujący mechanizm działania CSN. Kompleks sygnalny CSN wiąże białko p53 i uczestniczy w jego fosforylacji. Do tak uformowanego kompleksu przyłącza się ligaza MDM2 i ubiquitynuje białko p53. Następnie po uwolnieniu ligazy, ubiquitynowane białko p53 kierowane jest do proteasomu 26S i tam degradowane (ryc. 3).

FOSFORYLACYJNA AKTYWNOŚĆ KOMPLEKSU CSN

Udział CSN w regulacji stabilności specyficznych substratów nie ogranicza się tylko do współdziałania tego kompleksu z ligazami ubikwitynowymi, ponieważ powiązana z CSN fosforylacja również wpływa na proces degradacji.

Kompleks CSN izolowany z erytrocytów człowieka wykazuje aktywność fosforylacyjną [55]. Jednakże analizy sekwencji aminokwasowej kompleksu sygnalnego nie ujawniły sekwencji homologicznych do znanych kinaz białkowych. W związku z tym sugeruje się istnienie zależnej od CSN kinazy Ser/Thr [3, 30]. Jednym z kandydatów do roli zależnej od CSN kinazy białkowej jest JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). Badania Seegera i in. [55] wykazały zdolność kompleksu CSN do fosforylowania w pozycji Ser63 i Ser73 białka c-JUN, będącego także substratem docelowym dla enzymu JNK

(*c-Jun N-terminal Kinase*). Ufosforylowanie tych aminokwasów zapobiega ubikwitynacji białka c-JUN i w konsekwencji jego degradacji. Przeprowadzone badania wykazały bezpośrednią korelację między ilością kompleksu sygnałnego, stabilnością c-JUN i aktywnością czynnika transkrypcyjnego AP-1 (*Activating Protein 1*). Czynniki transkrypcyjne AP1 tworzone są przez homo- i heterodimery białek JUN, FOS, ATF [29], stąd stabilizacja białka c-JUN wpływa na ilość i co za tym idzie aktywność kompleksu AP1. Podwyższona ekspresja podjednostki CSN2 w komórkach HeLa (prawdopodobnie pociągająca za sobą wzrost ilości kompleksów CSN) powoduje akumulację białka c-JUN oraz dramatyczny wzrost aktywności AP-1. W tych warunkach kinaza JNK jest jednak nieaktywna [44]. Kinaza zależna od CSN jest konstytutywnie aktywna w czerwonych ciałkach krwi, komórkach HeLa, HL- 60 i MCF-7, podczas gdy JNK wymaga aktywacji przez szlak kinaz MAP [3]. Można wobec tego postulować istnienie innej drogi fosforylacji białka c-JUN zależnej od kompleksu sygnałnego CSN [44]. Jednakże istnieje powiązanie między JNK i kompleksem CSN. Wykazano hamujący wpływ N-końca podjednostki CSN1 na aktywność kinazy JNK i w konsekwencji na stabilizację białka c-JUN [61].

Ostatnie badania wykazały zdolność podjednostek kompleksu CSN do oddziaływań *in vitro* i *in vivo* z dwiema kolejnymi kinazami: CK2 (*Casein Kinase 2*) i PKD (*Protein Kinase D*) fosforylującymi zarówno białka c-JUN, jak i p53. Ponadto, podobnie jak CSN, są one aktywne w komórkach erytrocytów i HeLa [62]. Podsumowując te doniesienia można domniemywać istnienie szeregu kinaz, których aktywność może być w bliżej jeszcze nieznanym sposobie regulowana przez CSN.

Fosforylacyjna aktywność CSN wpływa w różny sposób na stabilność białek współdziałających z tym kompleksem. W przypadku pozytywnego regulatora fotomorfogenezy HY5, fosforylacja przeprowadzana prawdopodobnie przez kinazę CK2 zależną od CSN, chroni HY5 przed degradacją na świetle [47,62]. Natomiast fosforylacja białka p53 prowadzi w konsekwencji do jego degradacji [20, 21].

WSPÓLDZIAŁANIE KOMPLEKSÓW CSN, PROTEASOM 26S I EIF3

CSN, proteasom 26S i eIF3 tworzą rodzinę kompleksów białkowych zawierających charakterystyczną dla tych białek domenę PCI (*Proteasom, Cop9, eIF3*). Są to wielopodjednostkowe kompleksy białkowe zaangażowane w regulację rozwoju organizmów i transdukcję sygnałów w komórce, a ich wzajemne powiązanie wydaje się być szersze niż tylko obecność tej samej domeny [34].

Wiele badań wskazuje na bezpośrednie oddziaływanie między CSN a proteasomem 26S. W czasie izolacji CSN z erytrocytów ludzkich występuje on często razem z białkami proteasomu [55]. Na podstawie badań prowadzonych na drożdżach wykazano występowanie oddziaływań między podjednostką CSN1 a białkiem Rpn6 wchodzącym w skład proteasomu 26S. Podobne interakcje obserwowano w komórkach roślinnych

między wspomnianym powyżej białkiem proteasomalnym a podjednostką CSN7 kompleksu sygnalnego [34]. Badania na *Drosophila* wskazują z kolei na interakcję tego białka z podjednostką CSN2 [37]. Dane te razem z opisanym już wcześniej podobieństwem strukturalnym kompleksu sygnalnego z wieczkiem proteasomu 26S pozwalają na postawienie hipotezy o ścisłej współzależności między tymi kompleksami. W literaturze można spotkać sugestie o możliwości zastępowania wieczka proteasomu 26S przez kompleks CSN i tworzenia kompleksu proteasomu CSN [20, 53].

Współdziałanie CSN i eIF3 wydaje się być słabiej udokumentowane. Istnieją jednak pewne dowody, że oba kompleksy w pewien sposób ze sobą współdziałają. Trzy podjednostki eIF3: eIF3c, eIF3e, eIF3h wyizolowano z komórek kalafiora razem z kompleksem sygnalnym CSN [35]. Wiązanie się tych podjednostek z CSN potwierdzają badania *in vitro* i *in vivo* przeprowadzone na komórkach drożdży. Podjednostka kompleksu inicjacji translacji, eIF3c ma zdolność do wiązania się z CSN1 i CSN8 [32]. Wzór ekspresji eIF3c jest podobny do ekspresji innych białek tworzących kompleks sygnalny CSN i wzrasta po wystawieniu roślin na światło. Kodujące eIF3c mRNA jest akumulowane w kwiatach i korzeniach, lecz poziom białka jest wyższy w zielonych tkankach wegetatywnych (liściach i łodydze) [32]. Z kolei białko eIF3e oddziałuje z podjednostką CSN7 zarówno występującą w kompleksie CSN oraz w komórkach mutantów *csn9*, gdzie CSN7 występuje tylko w formie monomeru [69]. Dodatkowo wykazano, że eIF3e współdziała również z CSN6 i CSN7. Co ciekawe, białko eIF3e oddziałuje także z podjednostką Rpt4 części bażowej proteasomu 26S [23]. Dodatkowo warto wspomnieć, że podwyższona ekspresja eIF3e powoduje uzyskanie odporności na leki komórek drożdży podobnie jak wysoka ekspresja Rpn11 i CSN5. Choć nieznanym jest mechanizm molekularny tego zjawiska można jednak sugerować współdziałanie w tym procesie CSN, proteasomu 26S i eIF3 [34].

Powiązanie funkcjonalne między CSN i eIF3 nie jest jasne. Być może CSN reguluje aktywność translacyjną eIF3 i w konsekwencji wpływa na metabolizm specyficznych białek. Hipotezę taką potwierdzają doniesienia o zdolności do zmian lokalizacji komórkowej eIF3e stanowiącej podjednostkę kompleksu eIF3. eIF3e uznawana jest za podjednostkę regulatorową tego kompleksu ze względu na zdolności do zmian umiejscowienia w komórce *S. pombe* oraz fenotyp mutacji *eIF3e*, która w przeciwieństwie do mutacji w genach kodujących podjednostki strukturalne nie jest letalna i powoduje różnorodne zaburzenia m.in. sporulacji i segregacji chromosomów oraz zwiększoną wrażliwość na stres osmotyczny. Badania u roślin wykazały, że eIF3e może oddziaływać w zależności od tkanki z eIF3 na terenie cytoplazmy bądź też z CSN na terenie jądra. Natomiast podjednostki centralne kompleksu eIF3 wykazują stałą obecność cytoplazmatyczną [34].

Ustalenie dokładnych powiązań między kompleksami rodziny PCI wymaga dalszych badań, tym bardziej że ostatnio zidentyfikowano jeszcze kilka innych białek zawierających domeny PCI i MPN [34].

PODSUMOWANIE

Początkowo sugerowana rola kompleksu sygnałowego COP9 jako represora fotomorfogenezy w ciemności okazała się być tylko „wierzchołkiem góry lodowej” funkcji pełnionych przez CSN.

Zaangażowanie CSN w rozwój organizmów eukariotycznych następuje głównie przez regulację stabilności białek i może się odbywać na wielu poziomach. Poziom pierwszy to bezpośrednia modyfikacja docelowego białka (fosforylacja), która wpływa na jego stabilność. Poziom drugi to regulacja aktywności współdziałających z CSN ligaz ubikwityny (denedylacja kulliny), które przyłączając cząsteczki ubikwityny mogą kierować białka na drogę degradacji. Poziom trzeci to tworzenie samodzielnego kompleksu proteolitycznego (proteasom CSN). CSN wpływa prawdopodobnie także, dzięki współdziałaniu z eIF3 na syntezę związanych z tym kompleksem białek.

LITERATURA

- [1] ALARCON-VARGAS D, RONAI Z. p53-MDM2 the affair that never ends. *Carcinogenesis* 2002; **23**(4): 541–547.
- [2] BECH-OTSCHIR D, KRAFT R, HUANG X, HENKLEIN P, KAPELARI B, POLLMANN C, DUBIEL W. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 2001; **20**(7): 1630–1639.
- [3] BECH-OTSCHIR D, SEEGER M, DUBIEL W. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Science* 2002; **115**: 467–473.
- [4] BIANCHI E, DENTI S, CATENA R, ROSSETTI G, POLO S, GASPARIAN S, PUTIGNANO S, ROGGE L, PARDI R. Characterization of human constitutive photomorphogenesis protein 1 (huCOP1) a RING-finger ubiquitin ligase that interacts with Jun transcription factors and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* 2003; **278**(22): 19682–19690.
- [5] BIANCHI E, DENTI S, GRANATA A, BOSSI G, GEGINAT J, VILLA A, ROGGE L, PARDI R. Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate API activity. *Nature* 2000; **404**(6678): 617–621.
- [6] BOUNPHENG MA, MELNIKOVA IN, DODDS SG, CHEN H, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, CHRISTY BA. Characterization of the mouse Jab1 cDNA and protein. *Gene* 2000; **242**(1–2): 41–50.
- [7] CALLIS J, VIERSTRA RD. Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**(5): 381–386.
- [8] COHEN H, AZRIEL A, COHEN T, MERARO D, HASHMUELI S, BECH-OTSCHIR D, KRAFT R, DUBIEL W, LEVI BZ. Interaction between interferon consensus sequence-binding protein and COP9/signalosome subunit CSN2 (Trip15). *J Biol Chem* 2000; **275**(50): 39081–39089.
- [9] DACE A, ZHAO L, PARK KS, FURUNO T, TAKAMURA N, NAKANISHI M, WEST BL, HANOVER JA, CHENG S. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**(16): 8985–8990.
- [10] DENG XW, DUBIEL W, WEI N, HOFMANN K, MUNDT K, COLICELLI J, KATO J, NAUMANN M, SEGAL D, SEEGER M, GLICKMAN M, CHAMOVITZ DA, CARR A. Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunit: an essential regulator of development. *Trends Genet* 2000; **16**(5): 202–203.
- [11] DORONKIN S, DJAGAEVA I, BECKENDORF SK. CSN5/Jab1 mutations affect axis formation in the *Drosophila* oocyte by activating a meiotic checkpoint. *Development* 2002; **129**(21): 5053–5064.
- [12] ESTELLE M. Proteases and cellular regulation in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **4**(3): 254–260.
- [13] FARMER EE, ALMERAS E, KRISHNAMURTHY V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**(4): 372–378.

- [14] FENG S, MA L, WANG X, XIE D, DINESH-KUMAR SP, WEI N, DENG XW. The COP9 signalosome interacts physically with SCF^{COI1} and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* 2003; **15**(5): 1083–1094.
- [15] FERRELL K, WILKINSON CR, DUBIEL W, GORDON C. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**(2): 83–88.
- [16] FREILICH S, ORON E, KAPP Y, NEVO-CASPI Y, ORGAD S, SEGAL D, CHAMOVITZ DA. The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 1999; **9**(20): 1187–1190.
- [17] FU H, REIS N, LEE Y, GLICKMAN MH, VIESTRA RD. Subunit interaction maps for regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J* 2001; **20**(24): 7096–7107.
- [18] GHOSH M, HUANG K, BERBERICH SJ. Overexpression of Mdm2 and MdmX fusion proteins alters p53 mediated transactivation, ubiquitination and degradation. *Biochemistry* 2003; **42**(8): 2291–2299.
- [19] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubikwitynacji. *Post Biochem* 2002; **48**(1): 34–38.
- [20] HARDTKE CS, DENG XW. The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol* 2000; **124**(4): 1548–1557.
- [21] HARDTKE CS, GOHDA K, OSTERLUND MT, OYAMA T, OKADA K, DENG XW. HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* 2000; **19**(18): 4997–5006.
- [22] HERMIDA-MATSUMOTO ML, CHOCK PB, CURRAN T, YANG DC. Ubiquitylation of transcription factors c-Jun and c-Fos using reconstituted ubiquitylating enzymes. *J Biol Chem* 1996; **271**(9): 4930–4936.
- [23] HOEREAU ALVES KH, BOCHARD V, RETY S, JALINOT P. Association of the mammalian proto-oncoprotein Int-6 with the three protein complexes eIF3, COP9 signalosome and 26S proteasome. *FEBS Lett* 2002; **527**(1–3): 15–21.
- [24] HOFMANN K, BUCHER P. Protein sequence motifs, the PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**(6): 204–205.
- [25] HONG X, XU L, LI X, ZHAI Z, SHU H. CSN3 interacts with IKK γ and inhibits TNF but not IL-1-induced NF- κ B activation. *FEBS Lett* 2001; **499**(1–2): 133–136.
- [26] HORI T, OSAKA F, CHIBA T, MIYAMOTO C, OKABAYASHI K, SHIMBARA N, KATOS, TANAKA K. Covalent modification of all members of human cullin family protein by NEDD8. *Oncogene* 1999; **18**(48): 6829–6834.
- [27] KAMURA T, CONRAD MN, YAN Q, CONAWAY RC, CONAWAY JW. The RBX1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates RUB1 modification of Cullins CDC53 and Cul2. *Genes Development* 1999; **13**(22): 2928–2933.
- [28] KAPELARI B, BECH-OTSCHIR D, HEGERL R, SCHADE R, DUMDEY R, DUBIEL W. Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J Mol Biol* 2000; **300**(5): 1169–1178.
- [29] KARIN M, LIU Z, ZANDI E. AP1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**(2): 240–246.
- [30] KARNIOL B, CHAMOVITZ DA. The COP9 signalosome: from light signaling to general developmental regulation and back. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**(5): 387–393.
- [31] KARNIOL B, MALEC P, CHAMOVITZ DA. *Arabidopsis Fusca5* encodes a novel phosphoprotein that is a component of the COP9 complex. *Plant Cell* 1999; **11**(5): 839–848.
- [32] KARNIOL B, YAHALOM A, KWOK S, TSUGE T, MATSUI M, DENG XW, CHAMOVITZ DA. The *Arabidopsis* homologue of an eIF3 complex subunit associates with the COP9 complex. *FEBS Lett* 1998; **439**(1–2): 173–179.
- [33] KEPINSKI S, LEYSER O. Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. *Plant Cell Supplement* 2002; **14**: S81–S95.
- [34] KIM T, HOFMANN K, VON ARNIM AG, CHAMOVITZ DA. PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. *Trends Plant Sci* 2001; **6**(8): 379–386.
- [35] KWOK SF, SOLANO R, TSUGE T, CHAMOVITZ DA, ECKER JR, MATSUI M, DENG XW. *Arabidopsis* homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic *cop/det/fus* mutations. *Plant Cell* 1998; **10**(11): 1779–1790.
- [36] LIAKOPOULOS D, DOENGES G, MATUSCHEWSKI K, JENTSCH S. A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J* 1998; **17**(8): 2208–2214.
- [37] LIER S, PAULULAT A. The proteasome regulatory particle subunit Rpn6 is required for *Drosophila* development and interacts physically with signalosome subunit Alien/CSN2. *Gene* 2002; **298**(2): 109–119.

- [38] LYAPINA S, COPE G, SHEVCHENKO A, SERINO G, TSUGE T, ZHOU C, WOLF DA, WEI N, SHEVCHENKO A, DESHAIES RJ. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* 2001; **292**(5520): 1382–1385.
- [39] MAHALINGAM S, AYYAVOO V, PATEL M, KIEBER-EMMONS T, KAO GD, MUSCHEL RJ, WEINER DB. HIV-1 Vpr interacts with a human 34-kDa mov34 homologue, a cellular factor linked to the G2/M phase transition of the mammalian cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**(7): 3419–3424.
- [40] MAYTAL-KIVITY V, PICK E, PIRAN R, HOFMANN K, GLICKMAN MH. The COP9 signalosome-like complex in *S. cerevisiae* and links to other PCI complexes. *IJBCB* 2003; **35**(5): 706–715.
- [41] MAYTAL-KIVITY V, PIRAN R, PICK E, HOFMANN K, GLICKMAN MH. COP9 signalosome components play a role in the mating pheromone response of *S. cerevisiae*. *EMBO Rep* 2002; **3**(12): 1215–1221.
- [42] MULLER S, BERGER M, LEHEMBRE F, SEELER JS, HAUPT Y, DEJEAN A. c-JUN and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 2000; **275**(18): 13321–13329.
- [43] MUNDT KE, PORTE J, MURRAY JM, BRIKOS C, CHRISTENSEN PU, CASPARI T, HAGAN IM, MILLAR JB, SIMANIS V, HOFMANN K, CARR AM. The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Curr Biol* 1999; **9**(23): 1427–1430.
- [44] NAUMANN M, BECH-OTSCHIR D, HUANG X, FERRELL K, DUBIEL W. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem* 1999; **274**(50): 35297–35300.
- [45] ORON E, MANNERVIK M, RENCUS S, HARARI-STEINBERG O, NEUMAN-SILBERBERG S, SEGAL D, CHAMOVITZ DA. COP9 signalosome subunit 4 and 5 regulate multiple pleiotropic pathways in *Drosophila melanogaster*. *Development* 2002; **129**(19): 4399–4409.
- [46] OSAKA F, SAEKI M, KATAYAMA S, AIDA N, TOH-E A, KOMINAMI K, TODA T, SUZUKI T, CHIBA T, TANAKA K, KATO S. Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J* 2000; **19**(13): 3475–3484.
- [47] OSTERLUND MT, WEI N, DENG XW. The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol* 2000; **124**(4): 1520–1524.
- [48] PENG Z, SERINO G, DENG XW. A role of *Arabidopsis* COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* 2001; **128**(21): 4277–4288.
- [49] PENG Z, SERINO G, DENG XW. Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**(11): 2393–2407.
- [50] POUKKA H, KARVONEN U, JANNE OA, PALVIMO JJ. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**(26): 14145–14150.
- [51] POZO JC, ESTELLE M. The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**(26): 15342–15347.
- [52] REED JW. Roles and activities of Aux/IAA protein in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 2001; **6**(9): 420–425.
- [53] SCHWECHHEIMER C, DENG XW. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* 2001; **11**(10): 420–426.
- [54] SCHWECHHEIMER C, SERINO G, CALLIS J, CROSBY WL, LYAPINA S, DESHAIES RJ, GRAY WM, ESTELLE M, DENG XW. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin response. *Science* 2001; **292**(5520): 1379–1382.
- [55] SEEGER M, KRAFT R, FERRELL K, BECH-OTSCHIR D, DUDLEY R, SCHADE R, GORDON C, NAUMANN M, DUBIEL W. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J* 1998; **12**(6): 469–478.
- [56] SERINO G, SU H, PENG Z, TSUGE T, WEI, GU H, DENG XW. Characterization of the last subunit of the *Arabidopsis* COP9 signalosome: implications for the overall structure and origin of the complex. *Plant Cell* 2003; **15**(3): 719–731.
- [57] SERINO G, TSUGE T, KWOK S, MATSUI M, WEI N, DENG XW. *Arabidopsis cop8* and *fus4* mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome. *Plant Cell* 1999; **11**(10): 1967–1980.
- [58] SMITH P, LENG-CHIU WM, MONTGOMERY R, OSBORN A, KUZNICKI K, GRESSMAN-COBERLY E, MUTAPCIC L, BENNETT K. The GLH proteins, *Ceanorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Development Biol* 2002; **251**(2): 333–347.

- [59] SUZUKI G, YANAGAWA Y, KWOK SF, MATSUI M, DENG XW. *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev* 2002; **16**(5): 554–559.
- [60] TOMODA K, KUBOTA Y, ARATA Y, MORI S, MAEDA M, TANAKA T, YOSHIDA M, YONEDAKATO M, KATO Y. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27 (kip1) mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* 2002; **277**(3): 2302–2310.
- [61] TSUGE T, MATSUI M, WEI N. The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J Mol Biol* 2001; **305**(1): 1–9.
- [62] UHLE S, MEDALIA O, WALDRON R, DUMDEY R, HENKLEIN P, BECH-OTSCHIR D, HUANG X, BERSE M, SPERLING J, SCHADE R, DUBIEL W. Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J* 2003; **22**(6): 1302–1312.
- [63] WANG X, FENG S, NAKAYAMA N, CROSBY WL, IRISH V, DENG XW, WEI N. The COP9 signalosome interacts with SCF^{UFO} and participates in *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell* 2003; **15**(5): 1071–1082.
- [64] WANG X, KANG D, FENG S, SERINO G, SCHWECHHEIMER C, WEI N. CSN1 N-terminal-dependent activity is required for *Arabidopsis* development but not for Rub1/Nedd8 deconjugation of cullins: a structure-function study of CSN1 subunit of COP9 signalosome. *Mol Biol Cell* 2002; **13**(2): 646–655.
- [65] WANG Y, DEVEREUX W, STEWART TM, CASERO RA. Polyamine-modulated factor 1 binds to the human homologue of the 7a subunit of the *Arabidopsis* COP9 signalosome: implications in gene expression. *Biochem J*. 2002; **366**: 79–86.
- [66] WEE S, HETFIELD B, DUBIEL W, WOLF DA. Conservation of the COP9/signalosome in budding yeast. *BMC Genet* 2002; **3**(1): 15
- [67] WEI N, TSUGE T, SERINO G, DOHMAE N, TAKIO K, MATSUI M, DENG XW. The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol* 1998; **8**(16): 919–922.
- [68] WÓJCIK C. Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwityny. *Post Biol Kom* 1995; **22**(3): 295–315.
- [69] YAHALOM A, KIM TH, WINTER E, KARNIOL B, VON ARNIM AG, CHAMOVITZ DA. *Arabidopsis* eIF3e (INT-6) associates with both eIF3c and the COP9 signalosome subunit CSN7. *J Biol Chem* 2001; **276**(1): 334–340.
- [70] YANG X, MENON S, LYKKE-ANDERSEN K, TSUGE T, XIAO D, WANG X, RODRIGUEZ-SUAREZ RJ, ZHANG H, WEI N. The COP9 signalosome inhibits p27 (kip1) degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cul1. *Curr Biol* 2002; **12**(8): 667–672.
- [71] ZHOU C, SEIBERT V, GEYER R, RHEE E, LYAPINA S, COPE G, DESHAIES RJ, WOLF DA. The fission yeast COP9/signalosome is involved in cullin modification by ubiquitin-related Ned8p. *BMC Biochem* 2001; **2**(1): 7.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 06.11.2003 r.

Przyjęto: 02.01.2004 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,

pnowa@uni.torun.pl

WPLYW LIPIDÓW NA AKTYWNOŚĆ POLIMERAZ DNA

INFLUENCE OF LIPIDS ON DNA POLYMERASES ACTIVITY

Łukasz MATULEWICZ, Waldemar M. PRZYBYSZEWSKI

Centrum Onkologii – Instytut im. M.Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach

Streszczenie: Lipidy są ważnym elementem strukturalnym i funkcjonalnym systemu błonowego komórki. Będąc składnikiem zarówno cytoplazmy, jak i jądra wpływają na procesy wewnątrzkomórkowe. Obserwowany *in vitro* efekt tłumienia aktywności wyizolowanych i oczyszczonych polimeraz, związanych z metabolizmem DNA przez kwasy tłuszczowe, lipidy złożone oraz produkty peroksydacji lipidów, może stanowić część składową mechanizmu kontrolującego proliferację i różnicowanie się komórek *in vivo*.

Słowa kluczowe: polimerazy, kwasy tłuszczowe, lipidy złożone, produkty peroksydacji lipidów.

Summary: Lipids are very important structural and functional elements of cell membranes system. Being component of cytoplasm and nucleus regulate intracellular processes. Suppression of isolated and purified DNA related polymerases activity by fatty acids, complex lipids and lipid peroxidation products observed *in vitro* can be a part of mechanisms controlling cell proliferation and differentiation *in vivo*.

Key words: polymerases, fatty acids, complex lipids, lipid peroxidation products.

1.WSTĘP

Deoksynukleotydylotransferazy (polimerazy) DNA (EC 2.7.7.7) to grupa podstawowych enzymów zaangażowanych w mechanizm replikacji, rekombinacji i naprawy DNA, a w konsekwencji w podział komórki. Zahamowanie ich aktywności prowadzi do śmierci komórek proliferujących. Efekty hamowania aktywności enzymów są wykorzystywane w badaniach doświadczalnych i mogą stanowić element mający potencjalne znaczenie w terapii nowotworów.

Polimerazy DNA, których ekspresję wykazano w komórkach ssaków, oznaczane symbolami: α (alfa), β (beta), γ (gamma), ϵ (epsilon), δ (delta), ζ (dzeta), η (eta), θ (teta) uważa się za kluczowe enzymy zabezpieczające integralność genomu w trakcie procesów: podziału komórki, naprawy oraz rekombinacji molekuly DNA. Klasyfikacja polimeraz DNA została oparta na wynikach analizy homologii sekwencji i podobieństwa strukturalnego. Obejmuje ona 5 różnych klas (rodzin) sygnowanych literami: A, B, C, X, Y.

Jądrowe polimerazy replikacyjne: α , δ , ϵ , przynależą do klasy B. Mitochondrialną polimerazę γ zabezpieczającą proces replikacji i naprawy mitochondrialnego DNA zaliczono do klasy A. Wyczerpująca powyższe zagadnienie klasyfikacja wymienionych powyżej i pozostałych polimeraz, ich struktura molekularna oraz funkcjonowanie zostało przedstawione w pracach przeglądowych [7, 9].

W badaniach podstawowych *in vitro* struktury i funkcji licznych klas polimeraz DNA analizowany jest również wpływ lipidów na ich aktywność enzymatyczną. Pozwala to, z jednej strony, na precyzyjne określanie roli tych enzymów *in vivo*, z drugiej zaś strony – na rozwój potencjalnych strategii terapeutycznych w terapii nowotworów, a zwłaszcza chemioterapii.

Związkami, które wpływają na aktywność tej grupy enzymów, okazały się być nie tylko długołańcuchowe kwasy tłuszczowe [17], lecz także i złożone lipidy: glikolipidy [30], gangliozydy [28], sulfolipidy [27], jak również nadtlenki steroli [22] oraz produkty peroksydacji lipidów [36].

Kwasy tłuszczowe są związkami hydrofobowymi i szybki ich metabolizm nie byłby możliwy bez udziału białek wiążących te kwasy. Związanie kwasu tłuszczowego z białkiem wiążącym decyduje o wzroście rozpuszczalności powstałego kompleksu w środowisku wodnym. W komórkach kwasy tłuszczowe stanowią zarówno element strukturalny, jak i funkcjonalny systemu błon komórkowych. Podlegają one procesom estryfikacji głównie do glicerolipidów. Kwasy tłuszczowe są uwalniane w wyniku hydrolizy trójacyloglicerydów i fosfolipidów w reakcji, którą katalizują enzymy: lipaza i fosfolipaza. Znajdujące się w osoczu niewielkie ilości niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych pozostają związane z albuminą.

Niezestryfikowane kwasy tłuszczowe są wychwytywane przez białka wiążące usytuowane w błonach komórkowych celem wykorzystania ich w procesach metabolicznych między innymi: beta-oksydacji odbywającej się w mitochondriach lub peroksysomach kardiomiocytów oraz magazynowania w formie trójacyloglicerydów pod postacią kropli tłuszczu w adipocytach (omówiono w artykułach przeglądowych – [24, 25]).

2. KWASY TŁUSZCZOWE

Wielonienasycone, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe o konfiguracji *cis* wiązań podwójnych, wpływają hamująco na enzymatyczną aktywność niektórych enzymów związanych z metabolizmem DNA. Takimi enzymami okazały się być nie tylko polimerazy DNA, ale również deoksyrybonukleaza I (DNaza I) oraz topoizomerazy I i II [17, 18]. Wysoką skutecznością hamowania aktywności polimeraz DNA α i β odznaczają się kwasy tłuszczowe o długim łańcuchu węglowym C24 (kwas nerwonowy)

w przeciwieństwie do kwasów o krótszym łańcuchu C18 (kwas linolowy). Kwasy tłuszczowe zawierające 16 i mniej atomów węgla w łańcuchu nie wpływają na aktywność polimeraz [19]. Polimeraza β (klasa X), enzym o masie molekularnej 39 kDa złożony jest z dwóch fragmentów (domen), N-terminalnej 8 kDa i C-terminalnej 31 kDa [2]. Cechą domeny 8 kDa jest powinowactwo do molekuly startera matrycy DNA (*ang. template primer DNA*) substratów (deoksyrybonukleotydy), jak również do kwasów tłuszczowych. Sytuacja taka powoduje pojawienie się efektów działania kompetycyjnego (współzawodnictwa) między tymi cząsteczkami. Wiązanie się kwasu tłuszczowego z domeną 8 kDa zostało określone jako fizjologicznie specyficzne i pokazało, że fragment enzymu o masie 8 kDa wiąże kwas tłuszczowy w stosunku 1 : 1 [20]. Polimeraza ta, zaliczana do enzymów naprawczych DNA, stanowi ważny element składowy mechanizmu określanego mianem: naprawa przez wycinanie (*ang. base excision repair – BER*) [9].

W przeciwieństwie do tego, mechanizm hamowania aktywności enzymu polimerazy DNA α przez kwasy tłuszczowe nie jest oparty na zjawisku kompetycji, co wskazywałoby na strukturalną odmienność miejsc wiążących substrat, matrycę DNA oraz kwas tłuszczowy.

Polimeraza DNA α jest białkowym kompleksem tetramerycznym. Podjednostkę katalityczną tworzą trzy różniące się domeny:

- 1) N-terminalna – utrzymująca kompleks;
- 2) centralna – zawierająca miejsca wiążące: DNA, dNTP i zabezpieczająca przeniesienie fosforylu;
- 3) C-terminalna – oddziałująca z innymi podjednostkami.

Cechą wyróżniającą tego enzymu jest to, że dwie spośród trzech budujących enzym podjednostek charakteryzuje aktywność primazy DNA. Polimeraza DNA α wchodzi w skład kompleksu białek zapoczątkowujących syntezę DNA i syntetyzuje krótkie fragmenty hybrydowe RNA/DNA, które są następnie wykorzystywane przez polimerazy δ i ϵ w procesach elongacyjnych cząsteczki DNA [9].

Nasycone kwasy tłuszczowe: palmitynowy (16:0) i stearynowy (18:0) upośledzają aktywność enzymatyczną polimerazy DNA α , nie wpływając na zmianę aktywności enzymatycznej polimerazy DNA β [19]. Stopień nienasycenia oraz konfiguracja wiązań podwójnych kwasu tłuszczowego ma również wpływ na dynamikę aktywności enzymatycznej obu badanych polimeraz [17].

Kwas linolowy (LA) (cis-9-12-oktadekadienowy) stanowi nie tylko główny składnik codziennej diety, ale jest również cząsteczką prekursorową w syntezie m.in. kwasu arachidonowego (AA) biorącego udział w syntezie prostaglandyn (artykuł przeglądowy – [24]). Kwas nerwonowy (NA) z kolei jest składnikiem sfingomieliny stanowiącej element strukturalny m.in. tkanki mózgowej [16].

Kwasy tłuszczowe są źle rozpuszczalne w wodzie, a zwiększanie ich stężenia w roztworze wodnym powoduje tworzenie się metastabilnych (względnie stałych) kropli tłuszczu.

Badania nad mechanizmem hamowania aktywności enzymatycznej polimeraz DNA przez kwasy tłuszczowe: linolowy (LA) i nerwonowy (NA) znajdujących się w fazie dyspersyjnej (rozproszenia) wykazały, że aktywność enzymu ulega zanikowi w wyniku łączenia się z molekułą kwasu w formie monomeru, natomiast metastabilne krople

tłuszczu złożone z tych kwasów nie wpływają na tę aktywność, a białko enzymatyczne polimerazy nie absorbuje się na powierzchni kropli tłuszczu [21].

3. LIPIDY ZŁOŻONE

Fosfolipidy kwaśne pochodzenia zwierzęcego – fosfatydyloinozytol (PI), fosfatydyloinozytolo-4-monofosforan (PIP), fosfatydyloseryna (PS), kwas fosfatydowy (PA), kardiolipina (CAR) dodane do mieszaniny reakcyjnej wpływają hamująco (w różnym stopniu) na dynamikę reakcji syntezy cząsteczki DNA przez grasicze polimerazy α , δ , ϵ . Wysoką selektywnością cechuje się działanie fosfatydyloinozytoli (przewaga kwasów: stearynowego i arachidonowego), który hamuje aktywność polimerazy ϵ bardziej skutecznie niż polimerazy α i δ . Obserwuje się oddziaływania kompetycyjne tego lipidu z molekułą startera matrycy DNA, nie zaobserwowano natomiast takich oddziaływań w stosunku do substratu, którym był deoksytymidynotrójfosforan (dTTP). Dodanie zaś, do układu reakcyjnego, fosfatydyloinozytoli pochodzenia roślinnego (przewaga kwasów: linolowego i palmitynowego) powoduje zahamowanie aktywności nie tylko polimerazy ϵ , ale również polimerazy α [29].

Glikolipidy, a w grupie tej gangliozydy, są zasadniczo umiejscowione w zewnętrznej warstwie błony komórkowej, jakkolwiek niektóre wyniki badań sygnalizują ich obecność w jądrze komórkowym. Jądrowa lokalizacja gangliozydów sprawia, że teoretycznie rozważa się ich udział jako modulatorów wpływających na dynamikę aktywności syntezy molekuly DNA. Hipoteza taka znajdowałaby częściowe potwierdzenie w obserwowanym doświadczalnie *in vitro* wzroście ilości mRNA kodującego białko tubulinę przez gangliozyd GT1b, który jak się ocenia, jest efektywniejszym inhibitorem aktywności enzymatycznej polimerazy DNA β niż gangliozyd GM1 [28].

Badania *in vitro* pokazały, że glikolipidy zawierające w swej strukturze resztę kwasu siałowego lub siarkowego (sialozyloparaglobozyd – SPG), gangliozydy GM3, GM1, GD1A oraz ester siarczanu cerebrozydu) wpływały hamująco, w zależności od zastosowanego stężenia, na aktywność polimerazy DNA α wyizolowanej z grasicy. Inne glikolipidy – sfingozyna czy ceramid nie powodowały takiego efektu. Nie obserwowano oddziaływań kompetycyjnych glikolipidu zarówno z matrycą DNA, jak i substratami (deoksynukleotydotrójfosforany). Cząsteczka enzymu charakteryzuje się również, poza miejscami hydrofilowymi, obecnością miejsc hydrofobowych, z którymi wiążą się lipidy. Strukturalny element ceramidowy tworzący cząsteczkę glikolipidową – jak wykazano – jest niezbędny do uzyskania zahamowania aktywności polimerazy α . Reszta siarczanowa w cząsteczce estru siarczanu cerebrozydu (CSE) oraz reszta siałowa w cząsteczce gangliozydu stanowią zasadniczy element odpowiedzialny za hamowanie aktywności polimerazy DNA. W przeciwieństwie do tego, glikolipidy obojętne (glukozyloceramid, galaktozyloceramid, laktozyloceramid), jak również asialogangliozydy (GA1, GA2) nie wpływały na dynamikę aktywności polimerazowej [30].

Niektóre sulfolipidy pochodzenia roślinnego są również selektywnymi inhibitorami polimeraz DNA α i β i charakteryzują się przeciwnowotworową aktywnością [22].

Podobnie jak naturalne sulfolipidy także i chemicznie syntetyzowane pochodne oraz ich formy stereoizomeryczne upośledzają aktywność polimerazy DNA [8, 23].

4. PRODUKTY PEROKSYDACJI LIPIDÓW

Wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi w komórkach i tkankach ssaków są m.in. kwasy: linolowy (18:2), arachidonowy (20:4), dokozaheksaenowy (22:6). W wyniku procesów peroksydacji lipidów zachodzących zarówno w warunkach fizjologicznych *in vivo*, jak i indukowanych *in vitro* kwasy te są przekształcane do wodoronadtlenków sprzężonych. Wodoronadtlenki te podlegają chemicznym reakcjom przekształceniowym, których produktami są: epoksyhydroksy-, ketohydroksy-, dwuhydroksykwasów tłuszczowe. Dalszy lawinowy proces utleniania prowadzi do powstania dwuwodoronadtlenków kwasów tłuszczowych i wodoronadtlenków epidioksydów. Wodoronadtlenki epidioksydów powstają z kwasów tłuszczowych – 20:4 i 22:6, stanowiąc materiał chemiczny do syntezy dwualdehydu malonowego (MDA), jednego z lepiej poznanych aldehydowych produktów peroksydacji lipidów o właściwościach genotoksycznych i mutagennych [12].

Powyższe zasygnalizowane ogólnie procesy prowadzą również do pojawienia się grupy hydroksyalkenali, spośród których 4-hydroksynonenal (4HNE) i 4-hydroksyheksenal (4HHE) uważa się za biologicznie aktywne, a dla których molekułami prekursorowymi są: omega-3, omega-6 i omega-9 wielonienasycone kwasy tłuszczowe [26].

Hydroksyalkenale charakteryzują się właściwościami kancerostatycznymi. Wyniki badań uzyskane z doświadczeń przeprowadzonych na modelach zwierzęcych pokazały, że miejscowe stosowanie tej grupy związków powoduje inwolucję nowotworu [36]. Jakkolwiek dootrzewnowe podawanie 4HNE nie wpływa na dynamikę proliferacji litych guzów nowotworowych, co wynika prawdopodobnie z trudności w uzyskaniu wystarczająco wysokiego stężenia tego związku w komórkach guza.

Molekularny mechanizm odpowiedzialny za taki efekt pozostaje generalnie nieznanym. Alkenale są elektrofilicznymi czynnikami alkilującymi i spontanicznie reagują z grupami sulfhydrylowymi glutationu, cysteiny i białek. Jakkolwiek aktywność polimeraz DNA α i β wyizolowanych z komórek wątroby szczura i wysiękowego wątrobiaka Yoshida była blokowana przez 4-hydroksynonenal (4HNE), to wyniki analizy dynamiki inkorporacji znakowanej tymidyny wskazują raczej na przewagę upośledzenia innych procesów związanych z metabolizmem molekuly DNA, bardziej wrażliwych na działanie 4-HNE niż reakcji katalizowanej przez polimerazę DNA α [5].

5. LIPIDY JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Obserwowany w warunkach *in vitro* wpływ lipidów na aktywność polimeraz DNA może hipotetycznie odzwierciedlać podobne efekty *in vivo* w komórce. Rozważaniu takiego przypuszczenia sprzyja udokumentowana obecność lipidów w jądrze

komórkowym oraz wykazanie jądrowych szlaków sygnałowych za pomocą produktów hydrolizy lipidów [3, 4, 14, 15].

Jądrową pulę tłuszczu stanowią lipidy inozytolowe wpływające na procesy metaboliczne związane z proliferacją i różnicowaniem się komórek [4]. Metabolizm polifosfoinozytydów w jądrze komórkowym różni się, jest niezależny i bardziej złożony w porównaniu z metabolizmem lipidów inozytolowych usytuowanym w błonie cytoplazmatycznej [13]. Zasadniczą rolę w jądrowym cyklu metabolicznym lipidów inozytolowych pełni inozytydo-specyficzny enzym fosfolipaza C (PI-PLC) i jego cztery izoenzymy. Enzym ten hydrolizuje 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (PtdIns(4,5)P₂). Wynikiem takiej reakcji jest pojawienie się w kompartmentcie jądrowym dwóch molekuł przekaźnikowych II stopnia (*ang. second messenger*): wielonienasyconego 1,2-dwuacyloglicerolu (DAG) oraz inozytolo-1,4,5-trójfosforanu (Ins(1,4,5)P₃). Kolejnym enzymem tego cyklu jest fosfolipaza D (PLD) hydrolizująca glicerofosfolipidy (głównie fosfatydylocholinę PC) do kwasu fosfatydowego (PA). Kwas ten jest następnie przekształcany do jednonienasyconych i nasyconych dwuacylogliceroli (DAG). Poziom dwuacylogliceroli w jądrze komórkowym jest regulowany przez system enzymatyczny kinaz DAG oraz aktywuje kinazę białkową C (PKC) i jej izoenzymy [13].

Wyniki badań pokazały, że fosfolipidy nie są przypadkowo rozmieszczone w karioplazmie, lecz w kompartmentach jądra, gdzie odbywa się synteza, dojrzewanie i transport rybonukleoprotein. Zmiany w ich poziomie są związane ze stopniem dynamiki replikacji DNA [10, 11]. Badania *in vitro* nad wbudowywaniem i rozdziałem kwasów tłuszczowych: stearynowego (18:0), linolowego (18:2) i arachidonowego (20:4) pokazały, że kwasy te wnikały do jąder komórkowych i podlegały reakcji estryfikacji do lipidów w drodze metabolicznej z udziałem acetylo-CoA. Badania te potwierdziły istnienie specyficznej selektywności estryfikacji kwasów tłuszczowych w jądrze komórkowym wyrażającej się przewagą estryfikowania kwasów o dłuższym łańcuchu węglowym i wyższym stopniu nienasycenia [32–34]. Przeważającym ilościowo fosfolipidem jest fosfatydylocholina stanowiąca ponad 50% glicerofosfolipidów znajdujących się w jądrach komórek wątroby [35]. Należy dodać, iż obserwuje się również odmienne mechanizmy jądrowego metabolizmu tłuszczów w zależności od typu komórek [31].

6. PODSUMOWANIE

Lipidy są ważnym elementem strukturalnym i funkcjonalnym systemu błonowego komórki. Będąc składnikiem zarówno cytoplazmy, jak i jądra wpływają na procesy wewnątrzkomórkowe. Produkty ustrojowego metabolizmu oraz produkty peroksydacji lipidów stanowią naturalne ligandy dla receptorów jądrowych będących czynnikami transkrypcyjnymi. Może to stanowić podstawę do dyskusji nad hipotetycznym rozwojem nowych strategii terapii nowotworów z uwzględnieniem lipidów. Obserwowane *in vitro* efekty tłumienia aktywności wyizolowanych i oczyszczonych polimeraz DNA przez kwasy tłuszczowe, lipidy złożone oraz produkty peroksydacji lipidów mogą być podstawą do rozważań nad chemiczną charakterystyką inhibitorów enzymów związanych z metabolizmem DNA oraz precyzyjną analizą enzymatycznych miejsc wiążących.

LITERATURA

- [1] ALBI E, VIOLA-MAGNI M, LAZZARINI R, GAHAN PB. Chromatin phospholipid changes during rat liver development. *Cell Biochem Funct* 1991; **9**: 119–123.
- [2] BURGERS PMJ, KOONIN EV, BRUFORD E, BLANCO L, BURTIS KC, CHRISTMAN MF, COPELAND WC, FRIEDBERG EC, HANAOKA F, WINKLE DC, LAWRENCE CW, NAKANISHI M, OHMOWI H, PRAKASH L, PRAKASH S, REYNAUD C-A, SUGINO A, TODO T, WANG Z, WILL J-C, AND WOODGATE R. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001; **276**: 43487–43490.
- [3] COCCO L, MARTELLI AM, GILMOUR RS, RHEE SG, MANZOLI A. Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochem Biophys Acta* 2001; **1530**: 1–14.
- [4] COCCO L, MARTELLI AM, VITALE M, FALCONI M, BARNABEI O, GILMOUR RS, MANZOLI FA. Inositides in the nucleus: regulation of nuclear PI-PLC β 1. *Advan Enzyme Regul* 2002; **42**: 181–193.
- [5] ESTERBAUER H, SCHAUR RJ, ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**: 81–128.
- [6] FAENZA I, MATTEUCCI A, MANZOLI L, BILLI AM, PERUZZI D, ALUIGI M, VITALE M, CASTORINA S, SUH P-G, COCCO L. A role for nuclear PLC β 1 in cell cycle control. *J Biol Chem* 2000; **78**: 264–267.
- [7] FRIEDBERG EC, WAGNER R, RADMAN M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genes of mutations. *Science* 2002; **296**: 627–1630.
- [8] HANASHIMA S, MIZUSHINA Y, OHTA K, YAMAZAKI T, SUGAWARA F, SAKAGUCHI K. Structure-activity of a novel group of mammalian DNA polymerase inhibitors, synthetic sulfoquinovosylacylglycerols. *Jpn J Cancer Res* 2000; **91**: 1073–1083.
- [9] HUBSCHER U, MAYA G, SPADARI S. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 133–163.
- [10] MARALDI NM, ZINI N, SQUARZONI S, DEL COCCO R, SABATELLI P, MANZOLI FA. Intranuclear localization of phospholipids by ultrastructural cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 1383–1392.
- [11] MARALDI NM, SANTI S, ZINI N, OGRUBENCE A, RIZZOLI R, MAZZOTTI G, DIPRIMIO R, BAREGGI R, BERTAGNOLO V, PAGLIARINI C, CAPITANI S. Decrease in nuclear phospholipids associated with DNA replication. *J Cell Sci* 1993; **104**: 853–859.
- [12] MARNETT LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; **424**: 83–95.
- [13] MARTELLI AM, BARTUL R, TABELLINI G, ALUIGI M, PERUZZI D, BAREGGI R, NARDUCCI P, COCCO L. Re-examination of the mechanisms regulating nuclear inositol lipid metabolism. *FEBS Letters* 2001; **505**: 1–6.
- [14] MARTELLI AM, BARTUL R, TABELLINI G, BAREGGI R, MANZOLI L, NARDUCCI P, COCCO L. Diacylglycerol kinases in nuclear lipid-dependent signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**: 1129–1137.
- [15] MARTELLI AM, MANZOLI L, FAENZA I, BORTUL R, BILLI AM, COCCO L. Nuclear inositol lipid signaling and its potential involvement in malignant transformation. *Biochem Biophys Acta* 2002; **1603**: 11–17.
- [16] MARTINEZ M, MOUGAN I. Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *J Neurochem* 1998; **71**: 2528–2533.
- [17] MIZUSHINA Y, TANAKA N, YAGI H, KOROSAWA T, ONOUE M, SETO H, HORIE T, AOYAGI N, YAMAMOTO M, MATSUKAGE A, YOSHIDA S, SAKAGUCHI K. Fatty acids selectively inhibit eukaryotic DNA polymerase activities *in vitro*. *Biochem Biophys Acta* 1996; **1308**: 256–262.
- [18] MIZUSHINA Y, YAGI H, TANAKA N, KUROSAWA T, SATO H, KATSUMI K, ONOUE M, ISHIDA H, ISEKI A, NORA T, MOROHASHI K, HORIE T, ONOMURA Y, NARUSAWA H, AOYAGI N, TAKAMI K, YAMAOKA M, INOUE Y, MATSUKAGE A, YOSHIDA S, SAKAGUCHI K. Screening of inhibitor of eukaryotic DNA polymerases produced by microorganisms. *J Antibiot (Tokyo)* 1996; **49**: 491–492.
- [19] MIZUSHINA Y, YOSHIDA S, MATSUKAGE A, SAKAGUCHI K. The inhibitory action of fatty acids on DNA polymerase β . *Biochem Biophys Acta* 1997; **1336**: 509–521.
- [20] MIZUSHINA Y, OHKUBO T, DATE T, YAMAGUCHI T, SANEYOSHI M, SUGAWARA F, SAKAGUCHI K. Mode analysis of a fatty acid molecule binding to the N-terminal 8-kDa domain of DNA polymerase β . *J Biol Chem* 1999; **274**: 25599–25607.
- [21] MIZUSHINA Y, SAGISAKA M, SAKAI H, MASAHIKO A, SAKAGUCHI K. Mode analysis of binding of fatty acids to mammalian DNA polymerases. *Biochem Biophys Acta* 2000; **1486**: 211–218.

- [22] MIZUSHINA Y, WATANABE I, OHTA K, TAKAMURA M, SAHARA H, TAKAHASHI N, GOSA S, SUGIWARA F, MATSUKAGE A, YOSHIDA S, SAKAGUCHI K. Studies on inhibitors of mammalian DNA polymerase. *Biochem Pharmacol* 1998; **55**: 537–541.
- [23] MURAKAMI C, YAMAZAKI T, HANASHIMA S, TAKAHASHI S, OHTA K, YOSHIDA H, SUGAWARA F, SAKAGUCHI K, MIZUSHINA Y. Structure-function relationship of synthetic sulfoquinovosyl-acylglycerols as mammalian DNA polymerase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 2002; **403**: 229–236.
- [24] PRZYBYSZEWSKI WM, WIDEL M. Kwasy tłuszczowe jako potencjalny element wspomagający terapię nowotworów. *Post Hig Med Dośw* 2002; **56**: 589–602.
- [25] PRZYBYSZEWSKI WM, WALICHIEWICZ P. Regulacja procesów wewnątrzkomórkowych przez kwasy tłuszczowe i końcowe produkty peroksydacji lipidów. *Post Hig Med Dośw* 2002; **56**: 741–756.
- [26] PRZYBYSZEWSKI WM. Udział produktów peroksydacji lipidów w przeciwnowotworowym mechanizmie działania promieniowania jonizującego i cytostatyków radiomimetycznych. *Post Hig Med Dośw* 2001; **55**: 803–813.
- [27] SAHARA H, ISHIKAWA M, TAKAHASHI N, OHTANI S, SATO N, CASA S, AKINO T, KIKUCHI K. *In vivo* anti-tumour effect of 3'-sulphonoquinovosyl 1'-monoacylglyceride isolated from sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) intensine. *Brit J Canc* 1997; **75**: 324–332.
- [28] SCHENGRUND C-L, MUMMERT CM. Exogenous gangliosides: How do they cross the blood-brain barrier and how do they inhibit cell proliferation. *Ann NY Acad Sci* 1998; **845**: 278–284.
- [29] SHOJI-KAWAGUCHI M, IZUTA S, TAMIYA-KOIZUMI K, SUZUKI M, YOSHIDA S. Selective inhibition of epsilon DNA polymerase by phosphatidyloinositol. *J Biochem* 1995; **117**: 1095–1099.
- [30] SIMBULAN CMG, TAKI T, TAMIYA-KOIZUMI K, SUZUKI M, SAVOYSKI E, SHOJI M, YOSHIDA S. Sulfate- and sialic acid-containing glycolipids inhibit DNA polymerase alfa activity. *Biochem Biophys Acta* 1994; **1205**: 68–74.
- [31] SURETT ME, CHILTON FH. The distribution and metabolism of arachidonate-containing phospholipids in cellular nuclei. *Biochem J* 1998; **330**: 915–921.
- [32] VES-LOSADA A, BRENNER RR. Fatty acid D 5 desaturation in rat liver cell nuclei. *Mol Cell Biochem* 1995; **142**: 163–170.
- [33] VES-LOSADA A, BRENNER RR. Long-chain fatty acyl-CoA synthetase enzymatic activity in rat liver cell nuclei. *Mol Cell Biochem* 1996; **159**: 1–6.
- [34] VES-LOSADA A, BRENNER RR. Incorporation of D 5 desaturase substrate (dihomogammalinolenic acid, 20:3 n-6) and product (arachidonic acid 20:4 n-6) into rat liver cell nuclei. *Prostaglandin Leukotrien Essent Fatty Acids* 1998; **59**: 39–47.
- [35] VES-LOSADA A, MATE SM, BRENNER RR. Incorporation and distribution of saturated and unsaturated fatty acids into nuclear lipids of hepatic cells. *Lipids* 2001; **36**: 273–282.
- [36] ZOLLNER H, SCHAUR RJ, ESTERBAUER H. Biological activities of 4-hydroxyalkenals. In: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. (ed.) Sies H. Academic Press Ltd. London 1991: 337–369.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 04.08.2003r.

Przyjęto: 30.12.2003 r.

Adres autora: Ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

ANTYGEN CD34 I KOMÓRKI CD34 POZYTYWNE

CD34 ANTIGEN AND CD34-POSITIVE CELLS

Halina ANTOSZ

Zakład Genetyki Medycznej, Akademia Medyczna, Lublin

Streszczenie: Hematopoetyczna komórka macierzysta daje początek wielu typom komórek krwi i jest jedną z lepiej scharakteryzowanych komórek macierzystych w organizmie człowieka. Sugeruje się, że komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego są zdolne do zapoczątkowania rozwoju wielu typów komórek, włącznie z komórkami nerwowymi, mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, komórek wątrobowych, nabłonka jelit, skóry, płuc i nerek. Najważniejszym pozytywnym markerem dla ludzkich hematopoetycznych i progenitorowych komórek macierzystych jest antygen CD34. Chemicznie, CD34 jest sialomucyną – przezbłonową glikoproteiną. Występuje w dwóch alternatywnych formach: pełnej i skróconej, co jest wynikiem alternatywnego mechanizmu składania mRNA CD34. Sugeruje się, że CD34 pełni rolę w adhezji do zrębu mikrośrodowiska szpiku kostnego. Ekspresję CD34 wykryto na powierzchni śródbłonna małych naczyń krwionośnych. mRNA CD34 był również wykrywany między innymi w wątrobie, śledzionie i grasicy. Wbrew powszechnym dogmatom, ekspresję CD34 wykazano na dojrzałych komórkach tucznych. W ludzkiej krwi obwodowej we frakcji monocytarnej obecne są komórki zwane fibrocytami, których fenotyp charakteryzuje się m.in. obecnością antygeny CD34. W pracy tej przedstawiono najnowsze wyniki badań na temat cząsteczki CD34 i komórek CD34-pozytywnych.

Słowa kluczowe: antygen CD34, struktura, funkcja, komórki CD34 pozytywne, komórki macierzyste.

Summary: The hematopoietic stem cell, the common ancestor of all types of blood cells, is one the best-characterized stem cells in the body. It is suggested that stem cells derived from bone marrow are capable of giving rise to multiple cell types. These include neural cells, skeletal muscle, cardiac muscle, and hepatic cells, as well as epithelia of the gut, skin, lung and kidney. The antigen CD34 is the major positive marker for human hematopoietic stem, and progenitor cells. Chemically, CD34 is sialomucin – transmembrane glycoprotein. There are two species of CD34, full-length and truncated, derived from an alternative splicing mechanism of CD34 mRNA. It suggests that the CD34 plays a role in adhesion to the stromal microenvironment of bone marrow. CD34 is expressed by all small-vessel endothelial cells. Expression of CD34 mRNA has also been detected in liver, spleen, and thymus. Contrary to current dogma, CD34 is expressed by mature mast cells. In addition, there are CD34⁺ cells called fibrocytes that are present in monocyte fractions of human blood. In this paper is presented the current view on the recent research results of CD34 molecule and CD34 positive cells.

Key words: CD34 antigen, structure, function, CD34-positive cells, stem cells.

Wykaz stosowanych skrótów: HSC (Hematopoietic Stem Cell) – hematopoetyczna komórka macierzysta, VTXG – sekwencja aminokwasowa Val, Thr, X, Gly, RNIAEIIKDL – Arg, Asn, Ile, Ala, Glu, Ile, Ile, Lys, Asp, Leu, RT-PCR – odwrotna transkrypcja i powielanie cDNA metodą łańcuchowej reakcji polimera-

zy, **UTR** (*untranslated region*) – region nieulegający translacji, **VLA** (*very late antigen*) – antygen bardzo późny, **VCAM** (*vascular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, **LFA** (*lymphocyte function-associated antigen*) – antygen związany z czynnością limfocytów, **ICAM** (*intercellular adhesion molecule*) – międzykomórkowa cząsteczka adhezji, **RAG** (*recombination activating gene*) – gen aktywujący rekombinację, **TdT** – transferaza terminalnych nukleotydów, **G-CSF** – granulocytarny czynnik stymulujący tworzenie kolonii.

WPROWADZENIE

Terminem komórka macierzysta (*stem cell*) określa się komórki, które cechuje nieograniczona zdolność do samoodnowy i możliwość różnicowania do wielu typów komórek. Wyróżnia się dwie kategorie tych komórek. Pierwsza to: tzw. pluripotencjalne komórki macierzyste dające początek listkom zarodkowym: ektodermie, endodermie i mezodermie. Przykładem takich komórek są embrionalne komórki macierzyste (*ang. embryonic stem cells*) [16]. Druga kategoria to specyficzne potomstwo wymienionych komórek, tzw. multipotencjalne komórki macierzyste występujące w różnych tkankach u płodu i u osobników dorosłych (*ang. adult stem cells*), obejmujące np. hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC), neuronalne komórki macierzyste, wątrobowe komórki macierzyste itp. W ostatnich latach najczęściej rozpatrywanym prototypem tej drugiej kategorii są komórki HSC.

Biologia hematopoetycznych komórek macierzystych jest przedmiotem badań naukowych, doświadczeń klinicznych, doniesień biomedycznych i prasowych, a nawet dyskusji politycznych. Wynika to z terapeutycznych nadziei, jakie wiąże się z komórkami macierzystymi. Potencjalnym źródłem tych komórek jest szpik kostny. Trwają intensywne badania nad ich charakterystyką i markerami powierzchni, w celu zrozumienia biologicznej funkcji, jaką pełnią w stanach fizjologicznych i patologicznych człowieka oraz ewentualnym ich wykorzystaniu w transplantacji.

Doniesienia ostatnich lat stwarzają nadzieję na szersze wykorzystanie komórek HSC. Transplantacje hematologiczne prowadzone są z powodzeniem już od wielu lat. Z danych literaturowych wynika, że potencjał rozwojowy komórek HSC nie jest ograniczony jedynie do hematopoezy, gdyż są one zdolne do zapoczątkowania rozwoju wielu typów komórek, włącznie z komórkami nerwowymi [3, 25], mięśni szkieletowych [2, 10], mięśnia sercowego [2, 13, 30, 31], komórek wątrobowych [1, 19, 34, 46], komórek nabłonka jelit, skóry, płuc i nerek [33]. Tę szczególną zdolność zapoczątkowania rozwoju nowych typów komórek w innych narządach nazwano plastycznością komórek macierzystych.

Nie jest jednak pewne, czy to komórki HSC mają taki nieograniczony potencjał. Podstawą tych wątpliwości jest brak badań na idealnie czystych populacjach, na co zwracają uwagę Kondo i wsp. [16]. Być może inna subpopulacja bytująca w szpiku kostnym może być prekursorem wymienionych tkanek. W szpiku kostnym bytują zarówno komórki hematopoetyczne, jak i mezenchymalne komórki pnia, które dają początek komórkom o różnym przeznaczeniu. Nie można wykluczyć, że dodatkowe, tkankowo specyficzne komórki macierzyste, również zasiedlają szpik.

Przez ostatnie 20 lat badania komórek HSC zrewolucjonizowała metoda cytometrii przepływowej. Stworzyła ona możliwość analizy heterogennych tkanek, do których zalicza się szpik kostny, w celu określania ilości populacji komórek macierzystych i progenitorów komórkowych. Jednak w procedurze cytometrycznej, komórki macierzyste i progenitory komórkowe są tracone, a ich istnienie z konieczności jest dedukowane retrospektywnie.

Możliwość identyfikacji komórek HSC stworzyły aktywne, magnetyczne sortery komórkowe. Do tego celu niezbędna jest znajomość specyficznych kryteriów różnicujących. Za obecnie powszechnie przyjętą strategię separacji uznaje się istnienie lub brak ekspresji pewnych markerów powierzchni, które są nabywane lub tracone w trakcie rozwoju komórek hematopoetycznych.

Populację komórek macierzystych stanowią prawidłowe komórki diploidalne, niereplikujące, zatrzymane w fazie G_0/G_1 cyklu komórkowego. Ludzkie hematopoetyczne komórki macierzyste, gdy są w stanie „głębokiego” spoczynku (faza G_0), wykazują ekspresję antygen CD34, brak ekspresji markera Ki67, natomiast wejście w cykl komórkowy indukowane przez cytokiny jest niezwykle trudne [5].

CD34 – MARKER KOMÓREK HSC

Powszechnie uznanym markerem komórek macierzystych jest antygen CD34. Ekspresja tej cząsteczki na powierzchni komórek macierzystych szpiku kostnego jest niewielka i dodatkowo obniża się podczas różnicowania hematopoetycznego. Jedną z przeszkód używania tego antygeny jako markera do sortowania komórek, jest fakt, że ekspresja CD34 nie jest ograniczona jedynie do komórek macierzystych pnia, lecz występuje również na komórkach progenitorowych oraz w tkankach niehematopoetycznych. Co więcej ekspresja CD34 na komórkach HSC wydaje się być przejściowa i odwracalna [4]. Z badań Dao i wsp. [4] wynika, że bardzo czysta subpopulacja ludzkich komórek CD34 pozytywnych może generować *in vivo* powstawanie komórek CD34⁺, które po transplantacji wykazują ponowną zdolność tworzenia komórek CD34⁺. Sato i wsp. [41] uważają, że ekspresja CD34 może być odbiciem stanu aktywacji tych komórek. Jeśli więc ludzkie komórki HSC mogą mieć fenotyp CD34⁺ i CD34⁻, zaczęto poszukiwać markerów, które pozwoliłyby na ich identyfikację. Wydaje się, że kryterium to mogłaby spełniać glikoproteina CD133, której ekspresję stwierdza się na komórkach CD34⁺CD38⁻ oraz na niektórych progenitorach CD38⁺ [50]. Jedynie 0,2% komórek o fenotypie Lin⁻CD34⁻CD38⁻ wykazuje ekspresję CD133, dlatego sugeruje się, że antygen CD133 może być nawet lepszym wskaźnikiem komórek HSC niż CD34 [9].

Mimo wymienionych zastrzeżeń antygen CD34 uważany jest nadal za najbardziej pozytywny marker ludzkich HSC oraz komórek progenitorowych.

GEN I BIAŁKO CD34

Ludzki gen CD34 składa się z 8 eksonów o długości 27 kpz, w *locus* chromosomowym 1q32. Funkcja genu CD34 nie jest znana, chociaż jego lokalizacja z innymi znanymi cząsteczkami adhezji sugeruje cytoadhezyjną rolę CD34 [12]. Region ten zawiera również geny pewnych składowych układu dopełniacza, takie jak: L-selektyny/P-selektyny, E-selektyny, lamininy $\beta 2$ – włóknistej glikoproteiny, będącej elementem błon podstawowych i grupę genów RNA [21].

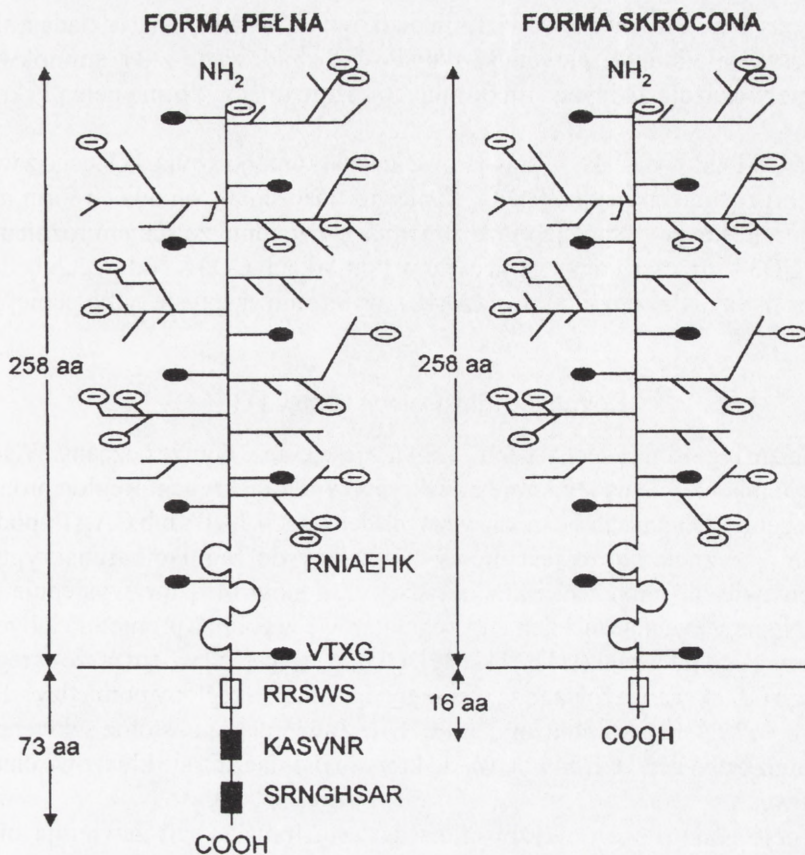
Dotychczas nie ma danych na temat rearanżacji w obrębie genu CD34, nawet w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej, gdzie ekspresja CD34 jest szczególnie wysoka. Nie ma również doniesień o ewentualnych rearanżacjach oraz o punktach mutacyjnych w *locus* CD34 w jakimkolwiek innym nowotworze.

Dwie formy białka CD34 jako wynik alternatywnego składania mRNA CD34

Produktem transkrypcji genu CD34 są dwa rodzaje mRNA CD34, pochodzące z alternatywnego mechanizmu składania i co za tym idzie dwie formy przezbłonowego białka CD34. Jeden rodzaj mRNA CD34 zawiera eksony od 1 do 8 i koduje białko o pełnej długości. U człowieka jest ono złożone z 385 aminokwasów i ma masę cząsteczkową ~110 kD [27]. Drugi rodzaj mRNA wywodzi się z insercji dodatkowego eksonu, tzw. eksonu X zawierającego kodon stop. U ludzi ma on długość 194 pz i jest wstawiany pomiędzy ekson 7 i 8. W wyniku translacji powstaje białko z krótszą cytoplazmatyczną domeną, zawierającą jedynie 16 aminokwasów, w porównaniu z pełną domeną obejmującą region 73 aminokwasów.

Pozakomórkowy region NH_2 silnie glikozylowany, identyczny w obu białkowych formach, jest kodowany przez ekson 4 i 5. Region ten zbudowany jest z 258 aminokwasów, zawiera 6 reszt cysteinowych, z homologią do błonowej nadrodziny immunoglobulinowej (Ig). Ponadto pozakomórkowa domena CD34 zawiera dwie sekwencje adhezji. Pierwsza z nich odpowiada sekwencji aminokwasowej VTXG, a druga – sekwencji adhezyjnej, złożonej z 10-aminokwasowego regionu RNIAEIIKDI. Potranslacyjna modyfikacja tego regionu CD34 polega na przyłączeniu reszt kwasu sialowego.

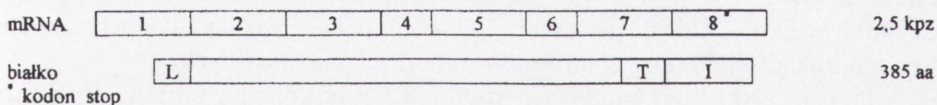
Eksony 7 i 8 kodują region COOH i domenę przezbłonową [21]. Region ten ma bardzo wysoki stopień podobieństwa międzygatunkowego (ponad 90% u człowieka, myszy i psa), a wysoka konserwatywność sugeruje funkcjonalne znaczenie tego regionu. Insercja eksonu X pomiędzy ekson 7 i 8 powoduje powstanie różnicy w budowie wewnątrzkomórkowego regionu białkowego. Forma krótsza nie ma domen zawierających wiele potencjalnych miejsc fosforylacji treoniny i tyrozyny, w tym docelowego miejsca dla białkowej kinazy C (PKC). Zostaje zachowane jedynie miejsce fosforylacji seryny. W formie dłuższej możliwa jest potranslacyjna modyfikacja wszystkich wymienionych miejsc. Sugeruje się, że z tego powodu mogą wynikać ewentualne funkcjonalne różnice obu białek.



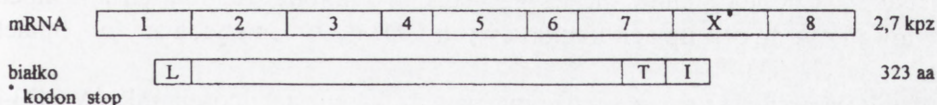
Legenda:

- wiązanie - N
- wiązanie - O CHO
- powtórzenia cysteiny
- reszta kwasu sialowego
- miejsca fosforylacji seryny
- miejsca fosforylacji PKC

Forma pełna CD34



Forma skrócona CD34



RYCINA 1. Struktura antygeny CD34 (schemat ten był publikowany przez: Krause DS., Facler MJ, Civin CI, May WS „CD34: Structure, biology, and clinical” Blood 1996;87:1-13 utility”)

Fragmety przezłonowe obydwu form białkowych są identyczne i składają się z 23 aminokwasów. Podobnie sekwencje sygnałowe, zbudowane z 31 aminokwasów, również nie wykazują żadnych strukturalnych różnic między formą pełną i skróconą [21].

Analiza RT-PCR wykazała, że prawidłowe ludzkie komórki szpiku kostnego zawierają obydwie formy transkrypcyjne CD34. Ponieważ znaczenie tych dwóch form nie jest jasne, sugeruje się, że ekspresja może zmieniać się zgodnie ze stanem różnicowania komórek CD34⁺. Interesujący jest fakt, że w komórkach CD34⁺, od trzech badanych chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML), wykazano ekspresję tylko pełnej formy mRNA [26].

Regulacja transkrypcji genu CD34

Mechanizm regulacji ekspresji genu CD34 nie jest jeszcze dobrze poznany. Wiadomo, że regulacja ma miejsce na poziomie transkrypcji i potranskrypcji. Region promotora ludzkiego genu CD34 nie zawiera klasycznych sekwencji TATA lub CAAT i podobnie jak region 3' wzmacniacza jest niewystarczający do regulacji transkrypcji. W przeciwieństwie do innych hematopoetycznych genów [45] nie występują żadne konserwatywne sekwencje lub elementy regulatorowe w pobliżu promotora lub regionu 5', nieulegającego translacji (UTR) [17, 39]. Okuno i wsp. [28] twierdzą, że w regulacji transkrypcji CD34 zaangażowane są elementy dystalne, tj. regiony pomiędzy -18 do -10 kb i/lub +17 do +26 kb poniżej genu CD34. Zawierają one istotne sekwencje dla ekspresji ludzkiego genu CD34 *in vivo*, do których przyłączają się kluczowe elementy regulatorowe.

Seqwencje genomowe powyżej miejsca startu transkrypcji zawierają miejsca wiązania dla *c-Myb*, *Ets-2*, *MZF-1* [21], [17] i *NFY* [39].

Wprawdzie, ekspresja CD34 w pierwotnych komórkach hematopoetycznych pęcherzyka żółtkowego i komórkach śródbłonna nie zależy od obecności *c-Myb*, to jednak ostateczna hematopoeza wymaga bezwzględnie jego obecności [18].

Produkt genu *c-Myc*, odgrywający istotną rolę w prawidłowym wzroście i rozwoju większości typów komórek proliferujących, jest również aktywny w komórkach CD34 pozytywnych. Produkt *c-Myc* wiąże się z DNA powyżej sekwencji kodującej CD34 podobnie jak czynniki transkrypcyjne SP-1, c-EBP i Pu1. MZF-1, białko o konfiguracji palca cynkowego wiąże się do promotora CD34 w linii komórek hematopoetycznych i podtrzymuje ekspresję w progenitorowych komórkach mieloidalnych.

Regulacja transkrypcji może być również warunkowana zmianą struktury chromatyny. Potencjalnym mechanizmem regulacji transkrypcji jest metylacja regionów bogatych w CpG na granicy pierwszego egzonu i intronu. Region ten jest hipermetylowany w dwóch liniach komórkowych CD34⁻ i niemetylowany w liniach komórkowych CD34⁺.

Regulacja potranskrypcyjna może mieć związek z niestabilnością mRNA CD34. Półokres życia transkryptu określony na 4,5 godziny może ulegać skróceniu na skutek

wystąpienia wielokrotnych kopii motywu ATTTTTA w regionie 3' UTR. Sekwencje bogate w AT są powszechnie związane z niestabilnością mRNA.

Ponadto potranskrypcyjny mechanizm może prowadzić do hamowania ekspresji CD34 na skutek nieprawidłowej transkrypcji. Taką nieprawidłową transkrypcję wykazano w liniach komórek CD34⁻. W ludzkim genie CD34 na końcu 5'UTR, bezpośrednio powyżej miejsca startu translacji jest region bogaty w GC, który predestynuje do powstania struktury drugorzędowej i pętli pełniącej rolę regulacyjną w transkrypcji lub w translacji. Z reguły jest to represja translacji. Wskutek tego, komórkom szybko brakuje powierzchniowej cząsteczki CD34 nawet wówczas, gdy mRNA CD34 jest wykrywany.

Funkcja sialomucyny CD34

Cząsteczka CD34 jest jedną z sześciu (obok CD43, CD45RA, CD162, CD164, PCLP-1) obecnie znanych, w rodzinie sialomucyn. Dokładna funkcja sialomucyny CD34 nie jest wyjaśniona. Ekspresja ludzkiej cząsteczki CD34 w hematopoetycznych komórkach myszy sugeruje rolę CD34 w adhezji do mikrośrodowiska podścieliska. Pomimo iż mechanizm mobilizacji komórek macierzystych do zasiedlania nadal jest niejasny, uważa się, że cytokiny i cząsteczki adhezyjne mają swój udział w adhezji komórek CD34⁺ do innych komórek oraz do komponentów *matrix* podścieliska szpiku [19]. O roli białka CD34 w adhezji może świadczyć pozakomórkowy N-terminalny region podobny do leukosialiny (sialoforyny) – CD43. Leukosialina obecna na ludzkich leukocytach, oprócz adhezji odgrywa rolę w aktywacji komórkowej. Zarówno CD34 i CD43 są substratami dla fosforylacji przez PKC. Badania Tada i wsp. [44] dowiodły, że obydwie wymienione sialomucyny mogą aktywować wspólną drogę przezbłonowej sygnalizacji, przez fosforylację tyrozyny niereceptorowych kinaz Lyn i Syk oraz białek pp60, pp69 i pp77. Fosforylacja ta jest specyficznie indukowana przez krzyżowe wiązanie CD34 lub CD43. Ustalono, że obydwie cząsteczki zawierają niektóre identyczne sekwencje aminokwasowe w domenach przezbłonowych. Stąd jest możliwe, że wspólny sygnał zewnątrzkomórkowy transdukcji może współdziałać z antygenami CD34 i CD43, inicjując reorganizację F-aktyny i poprzez to aktywować fosforylację tyrozyny.

Wykazano również pewne podobieństwo N-terminalnego regionu CD34 do cząsteczki CD45. Antygen CD45 jest przezbłonową glikoproteiną o aktywności fosfatazy tyrozynowej, występującej na powierzchni wszystkich jądrzastych komórek hematopoetycznych oraz na erytrocytach. Fosfataza CD45 jest ważnym ogniwem między receptorem błonowym limfocytów B i T a przemianą fosfatydyloinozytolu i powstawaniem wtórnych przekaźników. Antygen ten jest niezbędny w procesie aktywacji limfocytów B i T oraz komórek NK i makrofagów. Nie wiadomo jednak, czy podobną rolę pełni cząsteczka CD34.

L-selektyna (CD62L) – limfocytowy receptor zasiedlania może wiązać antygen CD34, którego ekspresję obserwuje się na komórkach wysokiego śródbłonna naczyń (HEV) w węzłach chłonnych. Wiązanie to jest specyficzne dla kwasu sialowego i zależne od jonów Ca²⁺. Fakt ten dowodzi roli antygeny CD34 w adhezji komórkowej. Komórki HSC, CD34⁺ mogą lokalizować się w różnych miejscach w szpiku, w wyniku wiązania się do cząsteczki L-selektyny. Pierwszy etap interakcji komórka-komórka to

wiązanie CD34 i L-selektyny. Drugi może angażować silne wiązanie integryny (np. VLA-4) na komórce CD34⁺ do jej ligandu – VCAM-1 na komórkach podścieliska szpiku [37]. Komórki HSC i komórki progenitorowe zatrzymane w ten sposób w krążeniu mogą następnie przechodzić proliferację i dojrzewanie. Krążące komórki CD34⁺ wykazują niższą ekspresję VLA-4 w porównaniu z komórkami CD34⁺ bytującymi w szpiku kostnym. To sugeruje, że uwolnienie komórek CD34⁺ i ich zdolność do krążenia jest uzależnione od obecności i poziomu ekspresji receptora VLA-4 [37]. Znaczącą redukcję funkcji receptora VLA-4 wykazano w komórkach CD34⁺ krwi obwodowej w porównaniu z komórkami w szpiku kostnym [23]. Funkcjonalny stan receptora VLA-4 komórek CD34⁺ może być zmieniany szybciej niż poziom ekspresji białka na powierzchni. Dane te sugerują, że modulacja stanu funkcjonalnego VLA-4 pociąga za sobą mobilizację komórek CD34⁺ [19].

Silverman i wsp. [42] sugerują, że CD34 jest cząsteczką sygnalizacyjną zaangażowaną w podtrzymywanie stanu fenotypowej plastyczności w komórkach niezróżnicowanych. Ponadto cząsteczki CD34 są włączone w kontrolowanie organizacji cytoszkieletu komórek, a zatem ich adhezji i migracji.

Hu i Chien [12] badali rolę cytoplazmatycznych domen cząsteczki CD34 (formy pełnej i skróconej) w adhezji komórkowej i w sygnalizacji proliferacji w komórkach hematopoetycznych. Uzyskane wyniki dowodzą, że cytoplazmatyczna domena CD34 jest wymagana do transdukcji sygnałów adhezji komórkowej, uczestnicząc w aktywacji istniejącej drogi sygnałowej LFA-1/ICAM-1. Jednocześnie nie wykluczają możliwości istnienia niezidentyfikowanych jeszcze cząsteczek adhezji, które również uczestniczą w tym procesie. Mechanizm, poprzez który kompleks LFA-1/ICAM-1 kooperuje z CD34 w adhezji komórkowej, jest nieznany.

Cytoplazmatyczna domena cząsteczki CD34 w proliferacji komórek wydaje się nie zawierać niezbędnych elementów do transdukcji sygnałów proliferacji komórek hematopoetycznych [12]. Wcześniejsze badania wskazują na rolę skróconej i pełnej izoformy białka CD34 w końcowym różnicowaniu komórek mieloidalnych zatrzymując je lub nie w stanie niedojrzałym. Fackler i wsp. [8] stosując interleukinę-6 (IL-6) lub białaczkowy inhibitor (LIF) obserwowali szybkie obniżenie endogennego mRNA CD34 po indukcji różnicowania mysich, białaczkowych, mieloidalnych komórek M1. Spadek ekspresji mRNA CD34 był skorelowany z różnicowaniem blastów do morfologicznie dojrzałych i funkcjonalnie aktywnych makrofagów. Zjawisku temu towarzyszyła ekspresja skróconej formy domeny cytoplazmatycznej białka. Natomiast forma pełnej długości białka CD34 występowała w komórkach M1, w których program końcowego różnicowania był zablokowany. Komórki te jako promonoblasty nie były zdolne do nabywania fenotypu dojrzałych makrofagów i przeprowadzania fagocytozy [8].

Watt i wsp. [48] sugerują, że cząsteczka CD34 jest funkcjonalnie wspierana przez sialomucinę CD164, która kooperuje w adhezji komórkowej do podścieliska szpiku kostnego oraz hamuje proliferację komórek macierzystych i progenitorowych – CD34 pozytywnych. McGuckin i wsp. [24], stosując wysoko-rozdzielczy laserowy mikroskop konfokalny, badali powierzchniową lokalizację obu cząsteczek, szczególnie istotnych dla transplantacji. Badania te zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [52] dowiodły, że obydwie cząsteczki wykazują ekspresję na pojedynczej komórce i dowodzą roli CD34 i

CD164 w zasiedlaniu, inhibicji cyklu komórkowego, adhezji do podścieliska szpiku kostnego i/lub wzrostu i różnicowania komórek HSPC CD34⁺. Autorzy nie wykluczają współdziałania również cząsteczki CD43 i innych cząsteczek w tym procesie [24].

HETEROGENNOŚĆ POPULACJI CD34 POZYTYWNEJ

Komórki CD34⁺ stanowią heterogenną populację HSC, ponieważ obejmują one także progenitory już wcześniej ukierunkowane na różne drogi różnicowania [22, 36]. W ostatnich latach komórki macierzyste lokalizowano wśród różnych tkanek dojrzałych. Coraz powszechniej uważa się, że istnieje możliwość samoodnowy tkanek całego ciała i może to być raczej regułą niż wyjątkiem [11, 14, 38]. Uznanym został pogląd, że komórki macierzyste – CD34⁺, występują w pewnych miejscach centralnego układu nerwowego (CUN), co sprzyja regeneracji tkanki w naturalnym fizjologicznym procesie [32]. Nie wiadomo wprawdzie, czy są to te same totipotencjalne komórki macierzyste pozostałe po okresie embrionalnym, które zasiedlają wszystkie samoodnawiające się tkanki, czy też każda z komórek macierzystych jest potomstwem komórek, które mają już ograniczony potencjał rozwojowy, w końcu czy są to komórki macierzyste wewnętrznie zmienione przez różnicowanie [6, 29]. Wyjaśnienie tej zagadki komplikuje fakt, że hematopoetyczne komórki macierzyste krążą w krwi (aczkolwiek w niewielkim odsetku w warunkach prawidłowych) i nie można wykluczyć, że to one zasiedlają tkanki. Odróżnienie komórek macierzystych krwio-pochodnych i tkankowo-specyficznych jest obecnie niemożliwe [15, 49]. Podczas prawidłowej hematopoezy, mała ilość komórek CD34⁺ jest obecna w krwi obwodowej, co sugeruje kontynuację migracji komórek macierzystych pomiędzy szpikiem a innymi organami, takimi jak wątroba lub śledziona, także w życiu pozazarodkowym [19]. Sanz i wsp. [40] udowodnili, że w krwi pępowinowej i krwi obwodowej ludzi dorosłych krążą populacje CD34⁺CD19⁺ i CD34⁺CD10⁺, które ze względu na ich fenotyp są uważane za progenitory komórek B. Dodatkowa analiza profilu ekspresji genów potwierdziła ekspresję genów wczesnego okresu różnicowania, takich jak: *Pax*, *RAG*, *TdT*, *CD79*.

Rekonstrukcja szpiku po chemioterapii lub aplikacja hematopoetycznych czynników wzrostu typu G-CSF, zapewniają źródła komórek macierzystych do celów terapeutycznych (transplantacji) ułatwiają mobilizację komórek CD34⁺ do wyjścia ze szpiku na obwód. Mechanizm tego procesu jest nadal niewyjaśniony.

Liczni uczeni podejmowali próby badania ekspresji pewnych genów istotnych dla hematogenezy. Phillips i wsp. [35] jako pierwsi wykorzystali technikę mikromacierzy do badania komórek macierzystych u myszy. Jednakże hematopoeza u człowieka różni się od hematopoezy u myszy, stąd Steidl i wsp. [43] porównywali ekspresję 1185 prawidłowych, ludzkich genów, komórek HSC CD34⁺ obecnych w szpiku kostnym i w krwi obwodowej. Celem badań było określenie zmian transkrypcyjnych, które odgrywają rolę w regulacji samoodnowy, różnicowania, mobilizacji i migracji tych komórek.

Analizowano geny kontrolujące cykl komórkowy, takie jak: geny cyklin, kinaz (w tym kinazy białkowej aktywowanej MAP-kinaza), inhibitory kinaz, geny kierujące cyklem komórkowym (w tym inicjatora wejścia w cykl życiowy – czynnika transkrypcyjnego E2F1), geny zaangażowane w replikację DNA. Badano 150 genów hormonów, czynników wzrostu, cytokin, chemokin i ich receptorów. 38 spośród nich wykazało ekspresję. W grupie badanej były geny receptora makrofagowego, specyficznego czynnika stymulującego powstawanie kolonii (M-CSF-R), receptora typu 4 (CXCR4) dla chemokiny CXC zw. też SDF1, insulino-podobnego czynnika wzrostu-wiążącego białko 2. Wszystkie wymienione geny wykazywały od 2 do 3 lub 4 razy wyższą ekspresję w komórkach CD34⁺ szpiku kostnego niż w komórkach CD34⁺ krwi obwodowej.

Natomiast komórki CD34⁺ krwi obwodowej miały zwiększoną ekspresję genów odpowiedzialnych za regulację apoptozy, tj. receptorów śmierci i związanej z nimi kinazy śmierci, genów kaspaz (3-ciej, 4-tej, 8-ej), genów kodujących cząsteczki powierzchniowe związane z adhezją, ekspresją genu receptora trombiny (PAR1), kinazy tyrozynowej *lyn*, białkowej kinazy C, kinazy theta, kinazy tec, cyklazy guanylowej β 1. Obserwowano w tych komórkach zwiększoną ekspresję GATA2 i N-myc. Produkty tych genów wraz z innymi czynnikami transkrypcyjnymi mogą przyczyniać się do zatrzymania różnicowania, krążących komórek CD34⁺, niezależnie od ich stanu różnicowania.

Przykłady te, to tylko niektóre z dużej listy badanych genów. Autorzy podkreślają, że analiza typu mikromacierzy, dzięki badaniu profilu ekspresji genów pozwala na odróżnienie komórek CD34⁺ szpiku kostnego od CD34⁺ krwi obwodowej. Jednocześnie podkreślają, że polimorfizm wymienionych genów prawidłowych komórek CD34⁺ szpiku kostnego jest znikomy.

Porównanie ekspresji genów komórek CD34⁺ szpiku kostnego i krwi obwodowej na poziomie molekularnym potwierdza, że komórki CD34⁺, rezydujące w szpiku kostnym, szybciej wchodzi w cykl komórkowy, podczas gdy krążące komórki CD34⁺ stanowią liczniejszą populację spoczynkowych komórek macierzystych/progenitorowych [43].

ZASKAKUJĄCA EKSPRESJA ANTYGENU CD34

O tym, że ekspresja CD34 nie jest ograniczona do hematopoetycznych komórek macierzystych, ale występuje na komórkach innych tkanek, między innymi na komórkach śródbłonna małych naczyń krwionośnych, donoszono już ponad 10 lat temu. Young i wsp. [51] kontynuując ten kierunek badań udowodnili, że antygen CD34 istotnie wykazuje ekspresję na śródbłonku naczyń wszystkich organów i tkanek nie tylko w życiu embrionalnym, ale również pozazarodkowym myszy. Antygen CD34 towarzyszy rozwojowi naczyń krwionośnych na każdym etapie, w stanach fizjologicznych i w procesie rekapitulacji angiogenezy w guzach nowotworowych.

Jednym z pierwszych, zaskakujących doniesień było przedstawienie przez Drew i wsp. [7] wyników badań wskazujących na to, że dojrzałe potomstwa komórek

hematopoetycznych – mysie komórki tuczne wykazują na powierzchni ekspresję antygeny CD34. Dlaczego utrzymana jest ekspresja białka CD34 w komórkach ostatecznie zróżnicowanych, nie wiadomo. Autorzy twierdzą, że komórki tuczne myszy z deficytem CD34 nie wykazują *in vitro* defektu dojrzewania, proliferacji i degranulacji. Obserwacja ta wg autorów dowodzi bardziej subtelnej roli CD34 w funkcji komórek tucznych. Spekuluje się, że cząsteczka CD34 sprawia, że komórki tuczne są bardziej ruchliwe i dzięki temu bardziej efektywna jest ich migracja do zainfekowanych tkanek.

Udział antygeny CD34 w dynamice komórek zdają się potwierdzać badania Tsukada i wsp. [47] na komórkach ludzkich. Wykazali oni ekspresję antygeny CD34 na powierzchni fibrocytów, obecnych we frakcji monocytarnej ludzkiej krwi obwodowej. Fibrocyty – dojrzałe komórki powstałe z fibroblastów również wykazują zdolność ruchu.

W tym kontekście obserwacja ta może wyjaśniać mechanizm mobilizacji komórek CD34⁺ przez G-CSF do wyjścia ze szpiku kostnego na obwód, albowiem ich bardziej spoczynkowymi odpowiednikami, pozostającymi w szpiku kostnym, są przeważnie CD34⁻.

Stwierdzenie obecności markera wczesnego etapu różnicowania, jakim jest antygen CD34, na powierzchni komórek dojrzałych, było wielką niespodzianką. Fakt ten zmusza do niezmiernie precyzyjnej charakterystyki fenotypowej komórek HSC (np. wykorzystującej inne różnicujące przeciwciała), aby nie dopuścić do zanieczyszczenia preparatów przeznaczonych do transplantacji innymi typami komórek z ekspresją antygeny CD34.

Poszukiwania kolejnych dojrzałych komórek CD34⁺ u ludzi są w toku. Ten kierunek badań kontynuuje wiele laboratoriów na świecie, istnieją więc podstawy, by oczekiwać dalszych zaskakujących wyników.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALISON MR, POULSON R, JEFFERY R, DHILLON AP, QUAGLIA A, JACOB J, NOOVELLI M, PRENTICE G, WILLIAMSON J, WRIGHT NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; **406**: 257.
- [2] BITTNER RE, SCHOFER C, WEIPOLTSHAMMER K, IVANOVA S, STREUBEL B, HAUSER E. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol* 1999; **199**: 391–396.
- [3] BRAZELTON TR, ROSSI FM, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; **290**: 1775–1779.
- [4] DAO MA, AREVALO J, NOLTA JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* 2003; **101**: 112–118.
- [5] DAO MA, TAYLOR N, NOLTA JA. Reduction in levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (kip-1) coupled with transforming growth factor beta neutralization induces cell-cycle entry and increases retroviral transduction of primitive human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13006–13011.
- [6] DORSHKIND K. Multilineage development from adult bone marrow cells. *Nat Immunol* 2002; **3**: 311–313.
- [7] DREW E, MERKENS H, CHELLIAH S, DOYONNAS R, MCNAGNY KM. CD34 is a specific marker of mature murine mast cells. *Exp Hematol* 2002; **30**: 1211–1218.

- [8] FACKLER M, KRAUSE D, SMITH O, CIVIN C, MAY W. Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood* 1995; **85**: 3040–3047.
- [9] GALLACHER L, MURDOCH B, WU DM., KARANU FN, KEENEY M, BHATIA M. Isolation and characterization of human CD34⁺ Lin⁻ and CD34⁺ Lin⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; **95**: 2813–2820.
- [10] GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND CD, BUZNEY EA, KHAN MK, FLINT AF, KUNKEL M., MULLIGAN RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; **401**: 390–394.
- [11] HORNER PJ, GUGE FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 2000; **407**: 963–970.
- [12] HU MC-T, CHIEN SL. The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling. *Blood* 1998; **91**: 1152–1162.
- [13] JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIESCHI KK, GOODELL MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1355–1356.
- [14] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**: 41–49.
- [15] KAWADA H, OGAWA M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001; **98**: 2008–2013.
- [16] KONDO M, WAGERS AJ, MANZ MG, PROHASKA SS, SCHERER DC, BEILHACK GF, SHIZURU JA, WEISSMAN IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 759–806.
- [17] KRAUSE DS, KAPADIA SU, RAJ NB, MAY WS. Regulation of CD34 expression in differentiating M1 cells. *Exp Hematol* 1997; **25**: 1051–1061.
- [18] KRAUSE DS, MUCENSKI ML, LAWLER AM, MAY WS. CD34 expression by embryonic hematopoietic and endothelial cells does not require c-Myb. *Exp Hematol* 1998; **26**: 1086–1092.
- [19] KRONENWETT R, MARTIN S, HAAS R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* 2000; **18**: 320–330.
- [20] LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L, WANG X, FINEGOLD M, WEISSMAN IL, GROMPE M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; **6**: 1212–1213.
- [21] LANZA F, HEALY L, SUTHERLAND DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; **15**: 1–13.
- [22] LeBIEN TW. Fates of human B cell precursors. *Blood* 2000; **96**: 9–3.
- [23] LICHTERFELD M, MARTIN S, BURKLY L, HAAS R, KRONENWETT R. Mobilization of CD34⁺ hematopoietic stem cells is associated with functional of the integrin very late antigen 4. *Br J Haematol* 2000; **110**: 71–81.
- [24] MCGUCKIN CP, FORRAZ N, BARADES MO, LOJO-RIAL C, WERTHEIM D, WHITING K, WATT SM, PETTENGELL R. Colocalization analysis of sialomucins CD34 and CD164. *Stem Cells* 2003; **21**: 162–170.
- [25] MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, McKERCHER SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000; **290**: 1779–1782.
- [26] NAKAMURA Y, KOMANO H, NAKAUCHI H. Two alternative forms of cDNA encoding CD34. *Exp Hematol* 1993; **21**: 236–242.
- [27] NATKUNAM Y, ROUSE RV, ZHU S, FISHER C, van de RIJN M. Immunoblot analysis of CD34 expression in histologically diverse neoplasms. *Am J Pathol* 2000; **156**: 21–27.
- [28] OKUNO Y, HUETTNER CS, RADOMSKA HS, PETKOVA V, IWASAKI H., AKASHI K, TENEN DG. Distal elements are critical for human CD34 expression *in vivo*. *Blood* 2002; **100**: 4420–4426.
- [29] ORKIN SH, ZON LI. Hematopoiesis and stem cell: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; **3**: 323–328.
- [30] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTIS, JAKONIUK I, ANDERSON SM. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701–705.
- [31] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERIA, ANVERSA P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS* 2001; **98**: 10344–10349.

- [32] PALMER TD, MARKAKIS EA, WILLHOITE AR, SAFAR F, GAGE FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cell from diverse regions of the adult. *CNS* 1999; **19**: 8487–8497.
- [33] PEREZ LE, RINDER HM, WANG C, TRACEY JB, MAUN N, KRAUSE DS. Xenotransplantation of immunodeficient mice with mobilized human blood CD34⁺ cells provides an *in vivo* model for human megacaryocytopoiesid and platelet production. *Blood* 2001; **97**: 1635–1643.
- [34] PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; **284**: 1168–1170.
- [35] PHILLIPS RL, ERNST RER, BRUNK B. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 2000; **288**: 1635–1640.
- [36] PIRELLI L, SCAMBIAG, BONANNO G, RUTELLA S, PUGGIONIP, BATTAGLIA A, MOZZETTI S, MARONE M, GIACOMO M, RUMI C, MANCUSO S, LEONE G. CD34⁺AC133⁺ cells isolated from cord blood are highly enriched in primitive circulating progenitors residing in G₀ phase of the cell cycle and contain all bone marrow and cord blood CD34⁺/CD38^{low} precursors. *Br J Haematol* 2000; **108**: 610–620.
- [37] PROSPER F, STRONCEK D, MCCARTHY JB, VERFAILLIE CM. Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. *J Clin Invest* 1998; **101**: 2456–2467.
- [38] QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP, FINATO N, BELTRAMI CA, NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERIA, ANVERSA P. Chimerism of the transplant heart. *N Engl J Med* 2002; **346**: 5–15.
- [39] RADOMSKA HS, SATTERTHWAITTE AB, TARANENKO N, NARRAVULA SS, KRAUSE DS, TENEN DG. A nuclear factor Y (NFY) site positively regulates the human CD34 stem cell gene. *Blood* 1999; **94**: 3772–3780.
- [40] SANZ E, ALVARES-MON M, MARTINEZ-A C, DE LA HERA A. Human cord blood CD34⁺ Pax⁺ B-cell progenitors: single-cell analyses of their gene expression profiles. *Blood* 2003; **101**: 3424–3430.
- [41] SATO T, LAVER JH, OGAWA M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999; **94**: 2548–2554.
- [42] SILVERMAN JS, TAMSEN A. Fibrohistiocytic differentiation in subcutaneous fatty tumors. Study of spindle cell, pleomorphic, myxoid, and a typical lipoma and dedifferentiated liposarcoma cases composed in part of CD34⁺ fibroblasts and FXIIIa⁺ histiocytes. *J Cutan Pathol* 1997; **24**: 484–489.
- [43] STEIDL U, KRONENWETT R, ROHR U-P, FENK R, KLISZEWSKI S, MAERCKER CH, NEUBERT P, AIVADO M, KOCH J, MODLICH O, BOJAR H, GATTERMANN N, HAAS R. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34⁺ hematopoietic stem cells. *Blood* 2002; **99**: 2037–2044.
- [44] TADA J, OMINE M, SUDA T, YAMAGUCHI N. A common signalling pathway via Syk and Lyn tyrosine Kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood* 1999; **93**: 3723–3735.
- [45] TENEN DG, HROMAS R, LICHT JD, ZHANG D-E. Transcription factor, normal myeloid development and leukaemia. *Blood* 1997; **90**: 489–519.
- [46] THEISE ND, BADVE S, SAXENA R, HENEGARIU O, SELL S, CRAWFORD JM, KRAUSE DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; **31**: 235–240.
- [47] TSUKADA N, BURGER JA, ZVAIFLER NJ, KIPPS TJ. Distinctive features of „nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2002; **99**: 1030–1037.
- [48] WATT S.M, BUTLER LH, TAVIAN M. BÜHRING HJ, RAPPOLD I, SIMMONS PJ, ZANNETTINO ACW, BUCK D, FUCHS A, DOYONNAS R, CHAN JY-H, LEVESQUE JP, PEAULT B, ROXANIS I. Functionally defined CD164 epitopes are expressed on CD34⁺ cells throughout oncogeny but display distinct distribution patterns in adult hematopoietic and nonhematopoietic tissues. *Blood* 2000; **95**: 3113–3124.
- [49] WRIGHT DE, WAGERS AJ, GULATI AP, JOHNSON FL, WEISSMAN IL. Physiological migration of hemetopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001; **294**: 1933–1936.
- [50] YIN A.H., MIRAGLIA S, ZANJANI ED, ALMEIDA-PORADA G, OGAWA M, LEARY AG, OLWEUS J, KEWRNEY J, BUCK DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; **90**: 5002–5012.

- [51] YOUNG PE, BAUMHUETER S, LASKY LA. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 1995; **85**: 96–105.
- [52] ZANNENTINO AC, BUHRINNG HJ, NIUTTA S, WATT SM, BENTON MA, SIMMONS PJ. Sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood* 1998; **92**: 2613–2628.

Redaktor prowadzący –J. Żeromski

Otrzymano: 22.09.2003 r.

Przyjęto: 30.12.2003 r.

ul Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin

MIKROJĄDRA W KOMÓRKACH CZŁOWIEKA – POWSTAWANIE, ZAWARTOŚĆ ORAZ WYKORZYSTANIE DIAGNOSTYCZNE I PROGNOSTYCZNE*

MICRONUCLEI IN HUMAN CELLS – FORMATION, CONTENTS,
DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC APPLICATION

Maria LUBKA^{1**}, Alina WOJDA¹, Michał WITT^{1,2}.

¹Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Zespół Genetyki Molekularnej i Klinicznej w Poznaniu, ²Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Streszczenie: Mikrojądra powstają w czasie mitotycznego podziału komórki i występują w cytoplazmie komórki potomnej w pobliżu jądra komórkowego. Głównymi mechanizmami przyczyniającymi się do ich tworzenia są złamania chromosomów i dysfunkcja aparatu mitotycznego. Mikrojądra mogą zawierać całe chromosomy lub chromatydy, fragmenty acentryczne lub fragmenty chromatyd. Zaobserwowano zmiany w częstości występowania i zawartości mikrojąder w zależności od choroby, procesu starzenia, działania różnorodnych czynników środowiskowych. Analiza liczby i zawartości mikrojąder wykorzystywana jest do oceny stopnia uszkodzeń chromosomów na poziomie pojedynczej komórki i do określania podatności na choroby degeneracyjne i nowotworowe oraz określania stopnia narażenia na czynniki środowiskowe.

Słowa kluczowe: mikrojądra, cytochalazyna B, komórki dwujądrowe, aberracje chromosomowe, niestabilność genetyczna.

Summary: Micronuclei are formed during mitotic cell division and they incidence in cytoplasm of daughter cell near the nucleus. The two basic phenomena leading to the formation of micronuclei are chromosome breakage and disfunction of the mitotic apparatus. Micronuclei can contain whole chromosomes or chromatids, acentric fragments or chromatid fragments. Several studies have shown that micronuclei frequencies and their contents is changing and depends on diseases, aging process and different envi-

*Praca częściowo finansowana z projektu badawczego zamawianego Komitetu Badań Naukowych nr PBZ-KBN-022/P05/1999 „Genetyczne i środowiskowe czynniki długowieczności” koordynowanego przez Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

**Autorka jest studentką V roku Wydziału Biotechnologii Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu.

ronmental factors. Analysis of micronuclei frequencies and their contents is used to measure chromosome damage at the level of single cell and to assess susceptibility to degenerative and malignant diseases and to assess degree of exposure to environmental factors.

Key words: micronuclei, cytochalasin B, binucleated cells, chromosomal aberrations, genetic instability.

I. WSTĘP

Mikrojądra są utworzone przez całe chromosomy, które na skutek zaburzeń wrzeciona podziałowego nie przesuwały się do biegunów dzielącej się komórki i pozostają w cytoplazmie. Powstają także z odłamanymi fragmentami chromosomów lub chromatydami nieposiadającymi centromeru, tzw. fragmentami acentrycznymi, które niepołączone z wrzecionem podziałowym pozostają w cytoplazmie [15]. Mikrojądra powstające spontanicznie są wyrazem niestabilności genetycznej komórki, natomiast mikrojądra indukowane odzwierciedlają wrażliwość komórki na indukcję uszkodzeń DNA i zdolność do naprawy tych uszkodzeń [60].

Od początku lat osiemdziesiątych, prowadzone są intensywne badania nad testem mikrojądrowym (MN – *micronucleus test*) i jego zastosowaniem do analizy nieprawidłowości obserwowanych na poziomie cytogenetycznym oraz do oceny stopnia uszkodzeń chromosomów na poziomie pojedynczej komórki.

II. MECHANIZM POWSTAWANIA MIKROJĄDER

Podstawowymi czynnikami przyczyniającymi się do powstawania mikrojąder w komórkach mitotycznych są złamania chromosomów i dysfunkcja aparatu mitotycznego. Opóźnienie ruchu chromatyd i chromosomów podczas anafazy powoduje tworzenie mikrojąder i jest uważane za główną przyczynę utraty chromosomów [12, 19]. Opóźnienie ruchu chromosomu może nastąpić w wyniku zaburzeń struktury centromeru, uszkodzenia włókna wrzeciona kariokinetycznego lub zmniejszonej produkcji tubuliny. Przerwane lub zniszczone włókno wrzeciona lub brak tubuliny prawdopodobnie wpływa na wszystkie chromosomy w sposób jednakowy, natomiast dysfunkcja centromeru lub kinetochoru może być mechanizmem chromosomowo-specyficznym. Wiadomo na przykład, że w nieaktywnych chromosomach X częściej stwierdzana jest obecność wadliwego kinetochoru (patrz praca przeglądowa [48]).

III. ANALIZA MIKROJĄDER

Wzrost poziomu uszkodzeń DNA, złamań chromosomów lub utraty chromosomów jest ważnym czynnikiem oceny ryzyka rozwoju nowotworów [7] oraz chorób degeneracyjnych związanych ze starzeniem, takich jak np. choroba Alzheimera [43].

Monitorowanie w komórkach człowieka wczesnych zmian genetycznych wymaga dokładnej, czulej, możliwie łatwej i szybkiej metody. Według Fenech [22] analiza mikrojąder powinna być prowadzona w komórkach, które ukończyły jeden podział jądra. Pozwala to na określenie częstości występowania spontanicznie powstających mikrojąder, jak i częstości występowania mikrojąder indukowanych promieniowaniem lub związkami chemicznymi. Metodą, pozwalającą na identyfikację takich komórek i oszacowanie uszkodzeń DNA na podstawie analizy mikrojąder, okazała się technika **CBMN** (*Cytokinesis block micronucleus assay*). Umożliwia ona analizę mikrojąder w komórkach (dwujądrowych), które ukończyły swój pierwszy podział *in vitro* po zadziałaniu określonego czynnika lub po inicjacji hodowlanej. Identyfikacja tych komórek jest ważna, ponieważ mikrojądra są tworzone w czasie podziału komórki i dokładne określenie częstości występowania mikrojąder jest możliwe jedynie w pierwszej pomiotycznej interfazie. Metoda opiera się na zastosowaniu cytochalazyny B, która hamuje powstanie bruzdy podziałowej podczas anafazy i pozwala na rozróżnienie komórek, które się nie podzieliły (jednojądrowe) od tych, które podzieliły się raz (dwujądrowe) i więcej razy (wielojądrowe komórki) [34]. Cytochalazyna B jest inhibitorem polimeryzacji aktyny, wskutek czego blokuje mitotyczną cytokinezę, ale nie blokuje podziału jądra. Komórki, które przeszły przez pierwszy podział komórkowy po zastosowaniu cytochalazyny B zawierają dwa jądra [22]. Technika ta wykorzystywana jest jako test *in vitro* w badaniach genotoksyczności oraz *in vivo* w badaniach skutków działania czynników genotoksycznych u ludzi. Pozwala ona na szybkie, tanie, powtarzalne i wiarygodne przeprowadzenie oceny mutacji chromosomowych na dużej liczbie komórek, polegającej na określeniu częstości występowania mikrojąder w komórce [14]. Materiałem do badań są najczęściej takie komórki, jak: limfocyty, fibroblasty oraz komórki nabłonkowe.

Za pomocą testu mikrojądrowego można również wykazać obecność fragmentów acentrycznych, ale nie można stwierdzić, czy delecje dotyczyły jednej, czy też obu chromatyd. Aby odpowiedzieć na to pytanie, stosuje się dodatkowe techniki barwienia. Barwienie kinetochorów lub barwienie centromerów techniką FISH pozwala na rozpoznanie, czy mikrojądro zostało utworzone przez fragment acentryczny oderwany od jednej bądź obu chromatyd, czy też zostało utworzone przez cały chromosom [15]. Dwie główne klasy mikrojąder (zawierające całe chromosomy lub chromatydy oraz zawierające fragmenty acentryczne) mogą być odróżnione od siebie poprzez wykorzystanie hybrydyzacji *in situ* (ISH) z sondami specyficznymi dla α -satelitarnego DNA wszystkich ludzkich chromosomów [53]. W tym celu wykorzystuje się **technikę FISH** (*Fluorescence in situ hybridization*), używając sond molekularnych specyficznych dla regionów centromerowych [1, 4]. Używanie sond pancentromerycznych, sondy centromerowej specyficznej dla chromosomu X oraz Y, pozwala na określenie udziału w mikrojądrach fragmentów acentrycznych, chromosomu X, chromosomu Y i autosomów [12, 19, 37]. Zatem zastosowanie techniki FISH z sondami specyficznymi dla centromerów pozwala stwierdzić, czy mikrojądra powstały w wyniku liczbowych czy strukturalnych aberracji chromosomowych [3, 22, 35]. Także sondy specyficzne dla sekwencji telomerowych pozwalają precyzyjnie określić zawartość mikrojąder. Jeżeli w mikrojądrze uzyskamy sygnał centromerowy i sygnały telomerowe wówczas wiemy, że zawiera ono cały chromosom. Obecność w mikrojądrze jedynie sygnałów telomerowych oznacza, że mikrojądro zawiera fragment acentryczny.

Mikrojądra mogą zawierać acentryczne fragmenty chromatydowe lub chromosomowe. Identyfikacja poszczególnych fragmentów w mikrojądrach jest możliwa w drodze detekcji sekwencji telomerowych i centromerowych z zastosowaniem techniki FISH (patrz praca przeglądowa [48]). Sondy specyficzne dla tych sekwencji są także wykorzystywane do określania klastogennego lub aneugenicznego działania czynników.

Technika FISH wykorzystywana jest także do identyfikacji rDNA, a w celu uwidocznienia aktywnych regionów organizatorów jąderka (NOR – *Nucleolar Organizing Regions*) stosuje się barwienie azotanem srebra. Techniki te pozwalają na rozróżnienie mikrojąder zawierających poszczególne całe chromosomy lub ich fragmenty [24].

Ocena potencjału genotoksycznego różnych związków chemicznych wymaga oszacowania możliwości indukowania aberracji strukturalnych (mutageny o działaniu klastogennym) i liczbowych (mutageny o działaniu aneuploidogennym). Aneuploidie są główną przyczyną niepowodzeń rozrodczych, znaczny jest także ich udział w rozwoju nowotworów. Dlatego ważne jest, aby każdy wzrost częstości występowania aneuploidii, wynikający z narażenia na czynniki chemiczne był rozpoznany i kontrolowany. Test mikrojądrowy zastosowany *in vitro* dla komórek dwujądrowych, umożliwia określenie możliwości indukowania uszkodzeń chromosomów przez czynniki chemiczne. Przeprowadzono wiele badań w celu identyfikacji całych chromosomów w mikrojądrach limfocytów, z zastosowaniem **przeciwciał antykinetochorowych** pozyskanych od pacjentów z **zespołem CREST** (*Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly and Telangiectasia*). Zastosowanie przeciwciał antykinetochorowych do analizy zawartości mikrojąder, pozwala na identyfikację mikrojąder zawierających i niezawierających kinetochor. Detekcja kinetochoru w mikrojądrach jest ważna przy identyfikacji czynników indukujących powstawanie aneuploidii [49].

IV. ZAWARTOŚĆ MIKROJĄDER

Utrata komórkowej informacji genetycznej w drodze tworzenia mikrojąder towarzyszy procesowi starzenia, różnorodnym chorobom, narażeniu na niekorzystne czynniki środowiskowe. Prowadzono wiele badań nad oceną zawartości mikrojąder. Przykładem badań tego procesu jest praca Leach i wsp. [39], w której określono pochodzenie chromo-somowego DNA włączanego do mikrojąder stosując technikę spektralnego karioty-powania (**SKY** – *Spectral karyotyping*) i technikę FISH. SKY to technika cytogenetyki molekularnej cechująca się dużą rozdzielczością i pozwalająca na identyfikację trudno zauważalnych translokacji chromosomów markerowych oraz na zdefiniowanie złożo-nych aberracji chromosomowych, za pomocą sond specyficznych dla poszczególnych chromosomów człowieka. Analizowano traktowane cytochalazyną B hodowle limfocytów trzech kobiet w wieku młodym, średnim i starszym. Metoda spektralnego kariotypowania ujawniła, że większość przeanalizowanych mikrojąder ma jednolity, pojedynczy kolor, sugerując, że zawierają DNA pochodzący z pojedynczego

chromosomu. Technika FISH z wykorzystaniem sond molekularnych specyficznych dla regionów centromerowych wykazała, że większość mikrojąder ma pojedynczy sygnał centromerowy. Choć analiza metodą SKY wykazała, że każdy z 23 chromosomów może być obecny w mikrojądrach, to jednak chromosom X występuje w nich najczęściej. Badania te potwierdziły hipotezę, że większość mikrojąder stwierdzanych u danej osoby zawiera DNA jednego i tego samego chromosomu.

U kobiet utrata chromosomu X w drodze tworzenia mikrojąder dotyczy głównie nieaktywnego chromosomu X [12, 55]. Nieaktywny chromosom X wykazuje szybsze, zależne od wieku, skracanie telomerów niż jego aktywny homolog i autosomy człowieka [55]. Przyspieszone skracanie telomerów może przyczyniać się do nieprawidłowej segregacji nieaktywnego chromosomu X. Skutkiem tego nieaktywny chromosom X jest częściej tracony w drodze tworzenia mikrojąder niż jego aktywny homolog [54].

Wysoka częstość tworzenia mikrojąder z chromosomem X u mężczyzn, mających chromosom Y i aktywny chromosom X wskazuje, że chromosom X ma generalną tendencję do eliminacji w drodze tworzenia mikrojąder [10]. Częściej utracie w drodze tworzenia mikrojąder ulega także chromosom Y. Zarówno utrata chromosomu Y, występowanie dodatkowego chromosomu Y, a także częstość występowania mikrojąder z chromosomem Y wzrasta z wiekiem [11].

Przeprowadzono także badania mające na celu analizę segregacji chromosomów płci w limfocytach krwi obwodowej kobiet i mężczyzn. Wykorzystano technikę FISH z zastosowaniem sond specyficznych dla regionów centromerowych chromosomów X i Y. Wykazano, że zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn częściej dochodzi do nieprawidłowej segregacji chromosomu X [12].

Zaangażowanie autosomów w tworzenie mikrojąder jest słabo poznane. Znacznie częściej mikrojądra zawierają chromosom X lub fragmenty acentryczne ([19]; patrz praca przeglądowa [61]). Jednakże, Fauth i wsp. [20] stosując technikę malowania chromosomów wykazali, że w mikrojądrach oprócz chromosomu X i Y, często występuje także chromosom pary 9. Przyczyną jest prawdopodobnie duży blok heterochromatynowy tego chromosomu. W większość spontanicznie powstających mikrojąder zawierających całe chromosomy, zaangażowane są także chromosomy akrocentryczne.

V. WYSTĘPOWANIE MIKROJĄDER W KOMÓRKACH A NARAŻENIE NA CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE, CHOROBY, PROCES STARZENIA I STYL ŻYCIA

1. Czynniki środowiskowe

Analiza liczby mikrojąder może być uważana jako użyteczny biomarker badania skutków narażenia na czynniki genotoksyczne.

Dobrze poznane jest zjawisko wzrostu liczby uszkodzeń chromosomów limfocytów po narażeniu na promieniowanie jonizujące [30, 57]. Promieniowanie indukuje różne formy uszkodzeń chromosomów, obejmujących wzrost częstości występowania

mikrojąder, a także aberracji chromosomowych [13]. Wykazano większą częstość występowania mikrojąder z centromerem po długotrwałym narażeniu na promieniowanie [57].

Garaj-Vrhovac i wsp. [24] wykorzystali test mikrojądrowy do analizy uszkodzeń DNA powstałych w wyniku działania ultradźwięków, u osób zawodowo narażonych na ich działanie. Oprócz techniki barwienia odczynnikiem Giemsy, zastosowali dodatkowe techniki barwienia, jak barwienie DAPI oraz azotanem srebra. Wykazano przewagę mikrojąder Ag-NOR dodatnich. Wskazuje to, że chromosomy z grupy D (13, 14, 15) oraz G (21, 22), czyli chromosomy akrocentryczne, są bardziej podatne na uszkodzenia indukowane działaniem ultradźwięków.

Wyniki badań nad wpływem pestycydów na indukcję uszkodzeń chromosomów, prowadzonych przy zastosowaniu analizy liczby mikrojąder, nie są jednoznaczne. W wielu pracach wykazano, że nie obserwuje się korelacji między indukcją uszkodzeń a narażeniem na złożone mieszaniny pestycydów [29, 41, 50]. Z kolei w innych badaniach stwierdzono, że taka korelacja występuje [2, 18, 25, 28]. Należy tu jednak zauważyć, że wyniki badań dotyczących narażenia na pestycydy *in vivo* różnią się między sobą, gdyż na każdym obszarze używana może być inna grupa pestycydów zależna od uprawianej rośliny i od czynników środowiskowych. Pod uwagę należy także wziąć fakt, że niepodlegające kontroli warunki pogodowe mogą wpływać na absorpcję związków chemicznych.

Badano również wpływ czynników karcynogennych (1,3-butadien, styren, alkeny) na częstość występowania mikrojąder i aberracji chromosomowych, np. u pracowników fabryki gumy. Częstość występowania mikrojąder i aberracji chromosomowych była znacznie wyższa w grupie osób narażonych niż w grupie kontrolnej. Stwierdzono, że poziom uszkodzeń DNA i częstość występowania mikrojąder korelują z liczbą lat pracy w fabryce [17].

Intensywnie badano również zawartość mikrojąder w komórkach człowieka, poddawanych działaniu różnorodnych substancji *in vitro*. Wykazano, że działanie określonych czynników powoduje skutki chromosomowo-specyficzne. Stosując technikę FISH analizowano częstość występowania spontanicznie powstających i indukowanych mikrojąder oraz nondysjunkcji chromosomu pary 8 i chromosomu X w dwujądrowych limfocytach kobiet dwóch grup wiekowych (22–26 i 47–50 lat). Jako czynniki indukcyjne zastosowano kolcemid i winkrystynę. Dla identyfikacji chromosomów w mikrojądrach zastosowano sondy pancentromeryczne. W celu oszacowania udziału chromosomu pary 8 i chromosomu X w nondysjunkcji i w tworzeniu mikrojąder, wykorzystano dwukolorową technikę FISH z sondami specyficznymi dla regionów centromerowych tych chromosomów. Stwierdzono, że mikrojądra zawierające całe chromosomy jak i fragmenty acentryczne chromosomów przeważają w grupie kobiet starszych. W mikrojądrach przeważnie występuje chromosom X, a częstość występowania nondysjunkcji wzrasta z wiekiem i dotyczy głównie chromosomu X. Kolcemid i winkrystyna powodują wzrost częstości występowania mikrojąder i nondysjunkcji chromosomu X i 8 w obu grupach [4].

W innych badaniach stwierdzono statystycznie istotną korelację między liczbą aberracji chromosomowych w limfocytach i liczbą mikrojąder w komórkach nabłonka jamy ustnej osób narażonych na działanie mutagenów lub karcynogenów środowiskowych [41, 51].

2. Styl życia

Alkohol wywiera mutagenny, karcynogeny i teratogeny wpływ na komórki. Wykazano wzrost liczby uszkodzeń chromosomów i zmian liczby chromosomów w limfocytach krwi obwodowej osób uzależnionych od alkoholu [32]. W pewnych badaniach określano nieprawidłowości chromosomów w limfocytach osób uzależnionych od alkoholu i osób nieuzależnionych. Ocenie poddano zawartość mikrojąder. Oparto się na analizie liczby mikrojąder połączonej z techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), z wykorzystaniem sond specyficznych dla regionów centromerowych chromosomów. Stwierdzono, że częstość występowania mikrojąder w dwujądrowych limfocytach wzrasta u osób uzależnionych od alkoholu. Technika FISH ujawniła wzrost u tych osób częstości występowania mikrojąder z sygnałem centromerowym. U osób uzależnionych od alkoholu nie wykazano natomiast związku między czasem uzależnienia a częstością występowania mikrojąder bez/z sygnałem centromerowym. Uzależnienie od alkoholu może być czynnikiem indukującym utratę chromosomów, co sugeruje możliwy aneugeniczny mechanizm działania alkoholu [42].

W badaniach dotyczących wpływu palenia tytoniu stwierdzono, że czynnik ten nie powoduje wzrostu częstości występowania mikrojąder [8, 9]. Thierens i wsp. [56, 57] nie zaobserwowali wpływu palenia tytoniu na częstość występowania mikrojąder z lub bez centromeru. Ponadto w wielu przypadkach obserwowano u palaczy mniejszą częstość występowania mikrojąder niż u osób niepalących. W innych badaniach wykazano wpływ palenia tytoniu na występowanie aberracji chromosomowych, ale również nie zaobserwowano zmiany w częstości występowania mikrojąder [5].

3. Proces starzenia

Wraz z wiekiem zdolności naprawcze komórek organizmu maleją. Liczne dane sugerują, że mechanizm leżący u podstaw procesu starzenia, obejmuje wzrastającą liczbę błędów w mitotycznym podziale komórek, w poreprodukcyjnym etapie życia, a także akumulację uszkodzeń w DNA. Bolognesi i wsp. [6] wykazali, że z procesem starzenia wiążą się zmiany w strukturze i funkcji chromosomów, a częstość spontanicznego występowania mikrojąder jest miarą uszkodzeń chromosomów i wzrasta ona wraz z wiekiem.

Cytogenetycy już dawno zauważyli, że częstość utraty chromosomów w ludzkich limfocytach wzrasta z wiekiem [52]. Związek między aneuploidią a tworzeniem mikrojąder i procesem starzenia został zauważony po raz pierwszy w połowie lat osiemdziesiątych przez Fenech i Morley [21]. Liczba mikrojąder zawierających cały chromosom (chromosom X lub autosom) wzrasta z wiekiem. Najczęściej w mikrojądrach występuje chromosom X. Wiąże się to ze wzrostem z wiekiem aneuploidii nieaktywnego chromosomu X u kobiet, wynikającej z przedwczesnego podziału centromeru lub innych nieprawidłowości centromeru nieaktywnego chromosomu X. Także badania nad określeniem związku między utratą z wiekiem chromosomu Y, a wzrostem liczby mikrojąder u mężczyzn, wykazały znaczący wzrost z wiekiem liczby mikrojąder zawierających chromosom Y [9, 12].

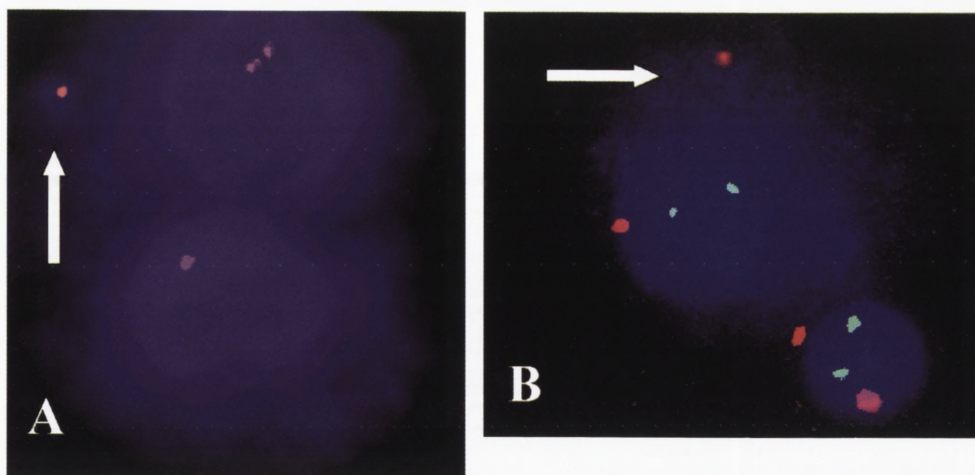
4. Choroby

Ocena częstości występowania mikrojąder, czy ich zawartości dotyczy nie tylko komórek osób zdrowych. W wielu badaniach analizie poddawano komórki osób chorych. Były to osoby z zespołem przedwczesnego starzenia, osoby z chorobami neuro-degeneracyjnymi, lub z chorobami nowotworowymi. Wyniki badań wykazały, że w określonych zespołach chorobowych zwiększa się częstość występowania mikrojąder, a także ich zawartość jest specyficzna dla danej choroby.

Już pod koniec lat siedemdziesiątych wykazano, że obniżenie poziomu naprawy DNA w pewnych zespołach genetycznych prowadzi do wzrostu liczby mikrojąder przypadających na komórkę [31]. Przykładem są osoby z **zespołem przedwczesnego starzenia**, np. z zespołem Wernera, Cockayne'a, Huthinson-Gilforda. Mikrojądra były często obserwowane w komórkach krwi obwodowej osób chorych na ataksję telangiektazję (pacjenci rzadko dożywają 20 roku życia), anemię Fanconiego, zespół Blooma, zwłaszcza po narażeniu na czynniki indukujące powstawanie uszkodzeń DNA (promieniowanie lub chemioterapia). Ponadto u osób z ataksją telangiektazją lub zespołem Wernera wykazano wysoką częstość występowania spontanicznie powstających mikrojąder [59]. Zastosowanie techniki molekularnej – FISH i klasycznej – barwienie odczynnikami Giemsa pozwoliło także na identyfikację u osób z zespołem Wernera zarówno niestabilnych, jak i stabilnych aberracji chromosomowych. Oba rodzaje aberracji występują częściej u osób z tym zespołem niż u osób zdrowo starzejących się [27]. Jest to związane z niestabilnością genomową lub chromosomową komórek w zespołach przedwczesnego starzenia.

W limfocytach osób chorych stwierdza się wzrost częstości występowania określonych typów mikrojąder. U pacjentów z chorobą Parkinsona w dwujądrowych limfocytach stwierdzono wzrost liczby mikrojąder bez sygnału centromerowego [44], u pacjentów cierpiących na mitochondrialną encefalopatię wykazano wzrost liczby mikrojąder z i bez centromeru [45]. Stwierdzono, że w limfocytach pacjentów z chorobą Alzheimera (choroba neurodegeneracyjna osób starszych charakteryzująca się postępującym osłabieniem pamięci i innych funkcji intelektualnych) może dochodzić do spontanicznych rearanżacji chromosomowych [26, 43]. Przeprowadzono także badania mające na celu oszacowanie częstości występowania spontanicznych i indukowanych rearanżacji chromosomowych w komórkach somatycznych (limfocyty, fibroblasty) pacjentów ze sporadyczną i rodzinną chorobą Alzheimera. Uzyskane wyniki wskazują, że częstość spontanicznego powstawania mikrojąder jest większa u pacjentów niż u zdrowych osób. Ich poziom jest podobny w obu grupach chorych. Z kolei częstość występowania indukowanych mikrojąder zależy od stosowanego czynnika indukcyjnego [58].

Wyniki badań nad częstością występowania mikrojąder wykazały, że już na początkowym etapie **procesu karcynogenezy** obserwuje się wzrost liczby mikrojąder. Jagetia i wsp. [33] wykazali, że w limfocytach pacjentów z chorobami nowotworowymi częstość występowania mikrojąder jest dwukrotnie wyższa, niż u zdrowych osób. Celem badań Kuramoto i wsp. [38] było zbadanie częstości występowania spontanicznych i indukowanych mikrojąder w limfocytach krwi obwodowej pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS). Stwierdzono większą częstość występowania mikrojąder



RYCINA 1. Komórki dwujądrowe z mikrojądrem po hybrydyzacji *in situ*, z zastosowaniem sond specyficznych dla regionów centromerowych: A – utrata chromosomu X w drodze tworzenia mikrojądra, B – utrata chromosomu pary 8 w drodze tworzenia mikrojądra, sygnał hybrydyzacyjny czerwony – chromosom 8; sygnał hybrydyzacyjny zielony – chromosom 4, strzałki wskazują mikrojądra

u tych pacjentów. Zaobserwowano także wzrost częstości występowania mikrojąder w limfocytach i komórkach nabłonkowych szyjki macicy u pacjentek z nowotworem szyjki macicy. Wykazano, że istnieje związek między częstością występowania mikrojąder i ryzykiem zachorowania oraz stopniem rozwoju nowotworu [40].

Oceniano także częstość występowania mikrojąder w komórkach nabłonka jamy ustnej u pacjentów z chorobami nowotworowymi. Badaniu poddano kobiety z rakiem sutka, z chorobą Hodgkina i z rakiem szyjki macicy oraz mężczyzn z rakiem płuc i z chorobą Hodgkina. Analiza wykazała znaczący wzrost liczby mikrojąder w komórkach tych pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną [47]. Także w komórkach nabłonkowych jamy ustnej pacjentek z rakiem sutka, częstość występowania mikrojąder jest znacząco wyższa niż u zdrowych kobiet [46].

Badania z zastosowaniem technik barwienia DAPI i Ag-NOR przeprowadzono u pacjentów chorych na nowotwór poddawanych chemioterapii. Wykazano różnice w uszkodzeniach chromosomów limfocytów krwi obwodowej u poszczególnych pacjentów. U większości pacjentów stwierdzono statystycznie znaczący wzrost liczby aberracji strukturalnych i liczby mikrojąder. U niektórych pacjentów wykazano większą częstość występowania mikrojąder z pozytywnym sygnałem pochodzącym od regionów wybarwionych DAPI i azotanem srebra (Ag-NOR). Wskazuje to na większą podatność na uszkodzenia chromosomów akrocentrycznych. Oba parametry mogą być stosowane do monitorowania zmian cytogenetycznych powstających w wyniku leczenia nowotworów [36].

Badano także poziom indukcji proliferacji komórek i tworzenia mikrojąder w nowotworowych komórkach jajnika po leczeniu estrogenami. Do badań wykorzystano

komórki z receptorem estrogenowym (BG-1), kontrolę stanowiły komórki bez receptora (UCI). Traktowanie komórek BG-1 estradiolem spowodowało znaczny wzrost proliferacji komórek i tworzenia mikrojąder. W przypadku komórek UCI, nawet po zastosowaniu 10-krotnie wyższych dawek estradiolu, nie doszło do postępującej proliferacji komórek i do wzrostu częstości tworzenia mikrojąder. Wyniki te wskazują, że wzrost genomowej niestabilności może wynikać ze wzrastającej proliferacji komórek mającej miejsce po stymulacji hormonalnej [54]. Badania te potwierdziły wyniki innych analiz, w których wykazano pozytywny związek między poziomem proliferacji komórek po stymulacji hormonalnej, a liczbą tworzonych mikrojąder w komórkach raka sutka mających receptor estrogenowy (MCF-7). Stwierdzono, że im wyższy poziom proliferacji komórek, tym większa liczba powstających mikrojąder. Stymulacja hormonalna komórek może prowadzić do wzrostu uszkodzeń chromosomowych najprawdopodobniej na skutek zakłóceń cyklu komórkowego [23]. Dumond i Roy [16] wykazali, że w wyniku leczenia hormonalnego dochodzi do redukcji naprawy uszkodzeń DNA i czasu trwania cyklu komórkowego. Ograniczony proces naprawy może być wynikiem bezpośredniego hamowania procesu naprawy lub tylko odzwierciedla ograniczony czas, jaki posiada komórka na naprawę zmian występujących w DNA. Uszkodzony mechanizm procesu naprawy DNA prowadzi do wzrostu częstości występowania mikrojąder. Jednakże estradiol nie uszkadza mechanizmu naprawy DNA bezpośrednio. To skracanie czasu trwania podziału komórkowego po stymulacji hormonalnej jest odpowiedzialne za zwiększoną genetyczną niestabilność komórek [54].

Ogólnie można stwierdzić, że wyższa częstość występowania mikrojąder odzwierciedla genetyczną niestabilność komórek somatycznych osób cierpiących na nowotwór.

VI. PODSUMOWANIE

Mikrojądra pochodzą z fragmentów chromosomów, a także całych chromosomów, nieprawidłowo rozdzielonych podczas podziału komórkowego. Analiza mikrojąder stosowana jest do oceny stopnia uszkodzeń chromosomów na poziomie pojedynczej komórki. Metoda ta jest łatwa do zastosowania w ludzkich limfocytach i tym samym nadaje się do prowadzenia badań monitoringowych na ludzkich populacjach. Obecnie stosowana jest do oceny wpływu środowiskowych i genetycznych czynników, jak i stylu życia na stabilność genetyczną. Częstość pojawiania się mikrojąder uważana jest za biomarker podatności na nowotwory oraz choroby degeneracyjne [14].

PIŚMIENNICTWO

- [1] ACAR H, CALISKAN U, DEMIREL S, LARGAESPADA DA. Micronucleus and their chromosomal origin related to therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: detection by micronucleus and FISH techniques. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; **21**: 341–347.
- [2] ANTONUCCI GA, De SYLLOS IM. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000; **20**: 265–272.

- [3] BACIUCHKA-PAMARO M, ORSIERE T, DUFFAUND F, SARI-MINODIER I, POMPILI J, BELLON L, De MEO M, DIGUE L, FAVRE R, BOTTA A. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat Res* 2002; **520**: 189–198.
- [4] BAKOU K, STEPHANOU G, ANDRIANOPOULOS C, DEMOPOULOS NA. Spontaneous and spindle poison-induced micronuclei and chromosome nondysjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes from two age groups of women. *Mutagenesis* 2002; **17**: 233–239.
- [5] BARALE R, CHELLOTTI L, DAVINI T. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen* 1998; **31**: 228–242.
- [6] BOLOGNESI C, LANDO C, FORNI A, LANDINI E, SCARPATO R, MIGLIORE L, BONASSI S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and Ageing* 1999; **28**: 393–397.
- [7] BONASSI S, HAGMAR L, STROMBERG U, MONTAGUD AH, TINNERBERG H, FORNI A, HEIKKILA P, WANDERS S, WILHARDT P, HANSTEEN IL, KNUDSEN LE, NORPPA H. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res* 2000; **60**: 1619–1625.
- [8] BONASSI S, NERI M, LANDO C, CEPPI M, LIN YP, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, FENECH M. HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus project. *Mutat Res* 2003; **543**: 155–166.
- [9] BUKVIC N, GENTILE M, SUSCA F, FANELLI M, SERIO G, BUONADONNA L, CAPRUSO A, GUANTI G. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res* 2001; **498**: 159–167.
- [10] CARERE A, ANTOCCIA A, CIMINI D, CREBELLI R, DEGRASSI F, LEOPARDI P, MARCON F, SGURA A, TANZARELLA C, ZIJNO A. Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes of 24 male subjects. *Mutagenesis* 1999; **14**: 491–496.
- [11] CATALAN J, AUTIO K, KUOSMA E, NORPPA H. Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 1464–1472.
- [12] CATALAN J, SURRALLES J, FALCK GHITA C-M, AUTIO K, NORPPA H. Segregation of sex chromosomes in human lymphocytes. *Mutagenesis* 2000; **15**: 251–255.
- [13] CHANG WP, HSIEH WA, CHEN D, LIN Y, HWANG JING-SHIANG, HWANG JENG-JONG, TSAI M, HWANG B. Change in centromeric and acentromeric micronucleus frequencies in human populations after chronic radiation exposure. *Mutagenesis* 1999; **14**: 427–432.
- [14] CIERNIAK A, KAPISZEWSKA M. Metoda mikrojąder w badaniach epidemiologicznych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 365–378.
- [15] DREWA G, FERENC T. Podstawy genetyki dla studentów i lekarzy. Wyd. Medyczne Urban i Partner, Wrocław 2003.
- [16] DUMOND JW, ROY D. The inhibition of DNA repair capacity by stilbene estrogen in Leydig cells: its implication in the induction of instability in the testicular genome. *Mutat Res* 2001; **483**: 27–33.
- [17] DUSINSKA, VODICKA, TULINSKA, SZABOVA, BARANCOKOVA, LISKOVA, RAUSOVA, SOMOROVSKA, FABRY, RIEGEROVA, PETROVSKA, KUBOVA, COLLINS. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the comet assay with cytogenetics methods and immunology. *Mutat Res* 1999; **445**: 181–192.
- [18] FALCK GC, HIRVONEN A, SCARPATO R, SAARIKOSKI ST, MIGLIORE L, NORPPA H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 1999; **441**: 225–237.
- [19] FALCK GC-M, CATALAN J, NORPPA H. Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutagenesis* 2002; **17**: 111–117.
- [20] FAUTH E, SCHERTHAN H, ZANKL H. chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C- and diethylstilboestrol- induced micronuclei. *Mutagenesis* 2000; **15**: 459–467.
- [21] FENECH M, MORLEY AA. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat Res* 1985; **148**: 99–105.
- [22] FENECH M. The *in vivo* micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; **455**: 81–95.
- [23] FISCHER WF, KEIWAN A, SCHMITT E, STOPPER H. Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis* 2001; **16**: 209–212.
- [24] GARAJ-VRHOVAC V, KOPJAR N. Incidence of micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of medical personnel occupationally exposed to ultrasound. *Neoplasma* 1999; **46**: 377–383.

- [25] GARAJ-VRHOVAC V, ZELJEZIC D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat Res* 2000; **469**: 279–285.
- [26] GELLER LN, POTTER H. Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 1999; **6**: 167–179.
- [27] GIRGOROVA M, BALAJEE AS, NATARAJAN AT. Spontaneous and X-ray-induced chromosomal aberrations in Werner syndrome cells detected by FISH using chromosome-specific painting probes. *Mutagenesis* 2000; **15**: 303–310.
- [28] GOMEZ-ARROYO S, DIAZ-SANCHEZ Y, MENESES-PEREZ MA, VILLALOBOS-PIETRINI R, DE LEON-RODRIGUEZ J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture workers group exposed to pesticides. *Mutat Res* 2000; **466**: 117–124.
- [29] GREGORIO D'ARCE LP, COLUS IM. Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000; **20**: 161–170.
- [30] HE JL, JIN HY, JIN LF, GAO SY. Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci* 2000; **13**: 32–36.
- [31] HEDDLE JA, BENZ RD, COUNTRYMAN PI. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique, W: H.J. EVANS, D.C. LLOYD (eds.) *Mutagen-induced Chromosome Damage in Man* University Press Edinburgh 1978: 191–200.
- [32] HUTTER E, MATTHIES U, NIKOLOVA T, EHRENREICH H, A follow-up study on chromosomal aberrations in lymphocytes of alcoholics during early, medium and long-term abstinence. *Alkohol Clin Exper Res* 1999; **23**: 344–348.
- [33] JAGETIA, JAYAKRISHNA, FERNANDES, VIDYASAGAR. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res* 2001; **491**: 9–16.
- [34] KIRSCH-VOLDERS M, FENECH M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 2001; **16**: 51–58.
- [35] KIRSCH-VOLDERS M, VANHAUWAERT A, De BOECK M, DECORDER I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res* 2002; **504**: 137–148.
- [36] KOPJARN, GARAJ-VRHOVAC V, MILAS I. Acute cytogenetic effects of antineoplastic drugs on peripheral blood lymphocytes in cancer chromosome aberrations and micronuclei. *Tumori* 2002; **88**: 300–312.
- [37] KRYSZCIO A, ULRICH MULLER WU, WOJCIK A, KOTSCHY N, GROBELNY S, STREFFER C. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int J Radiat Biol* 2001; **77**: 1087–1093.
- [38] KURAMOTO K, BAN S, ODA K, TANAKA H, KIMURA A, SUZUKI G. Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. *Leukemia* 2002; **16**: 2253–2258.
- [39] LEACH NT, JACKSON-COOK C. The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2001; **495**: 11–19.
- [40] LEAL-GARZA CH, CERDA-FLORES RM, LEAL-ELIZONDO E, CORTES-GUTI. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterus cancer. *Mutat Res* 2002; **519**: 211–212.
- [41] LUCERO L, PASTOR S, SUAREZ S, DURBAN R, GOMEZ C, PARRON T, CREUS A, MARCOS R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse markers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res* 2000; **464**: 255–262.
- [42] MAFFEI F, FIMOGNARI C, CASTELLI E, STEFANINI GF, FORTI GC, HRELIA P. Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis* 2000; **15**: 517–523.
- [43] MIGLIORE L, BOTTO N, SCARPATO R, PETROZZI L, CIPRIANI G, BONUCCELLI U. Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients. *Cytogenet Cell Genet* 1999; **87**: 41–46.
- [44] MIGLIORE L, PETROZZI L, LUCETTI C. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology* 2002; **58**: 1809–1815.
- [45] NACCARATI A, MOLINU S, MANCUSO M, SICILIANO G, MIGLIORE L. Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurol Sci* 2000; **21**: 963–965.
- [46] NERSESYAN AK. Risk assessment in the first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 679.

- [47] NERSESYAN, VARDAZARYAN, GEVORGYAN, ARUTYUNYAN. Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Archive of Oncology* 2002; **10**: 35–36.
- [48] NORPPA H, GHITA C., FALCK M. What do human micronuclei contain. *Mutagenesis* 2003; **18**: 221–233.
- [49] PARRY EM, PARRY JM, CORSO C, DOHERTY A, HADDAD F, HERMINE TF, JOHNSON G, KAYANI M, QUICK E, WARR T, WILLIAMSON J. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis* 2002; **17**: 509–521.
- [50] PASTOR S, GUTIERREZ S, CREUS A, XAMENA N, PIPERAKIS S, MARCOS R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001; **16**: 539–545.
- [51] PINTO, CEBALLOS, GARCIA, GUZMAN, DEL RAZO, VERA, GOMEZ, GARCIA, GONSEBATT. Increased cytogenetic damage in outdoors painters. *Mutat Res* 2000; **467**: 105–111.
- [52] SCHNEIDER E. The genetics of aging. Plenum Publishing Corporation New York New York 1978: 27–52.
- [53] SCHUELER MG, HIGGINS AW, RUDD MK, GUSTASHAW K, WILLARD HF. Genomic and genetic definition of a functional centromere. *Science* 2001; **294**: 109–115.
- [54] STOPPER H, SCHMITT E, GREGOR C, MUELLER SO, FISCHER WF. Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human. *Mutagenesis* 2003; **18**: 243–247.
- [55] SURRALLES J, HANDE MP, MARCOS R, LANSDORP PM. Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome. *Am J Hum Genet* 1999; **65**: 1617–1622.
- [56] THIERENS H, VRAL A, De RIDDER L, TOUIL N, KIRSCH-VOLDERS M, LAMBERT V, LAURENT C. Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers. *Int J Radiat Biol* 1999; **75**: 23–34.
- [57] THIERENS H, VRAL A, MORTIER R, AOUSALAH B, De RIDDER L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis* 2000; **15**: 245–249.
- [58] TRIPPI F, BOTTO N, SCARPATO R, PETROZZI L, BONUCCELLI U, LATORRACA S, SORBI S, MIGLIORE L. Spontaneous and induced chromosome damage in somatic cells of sporadic and familial Alzheimer's disease patients. *Mutagenesis* 2001; **16**: 323–327.
- [59] WERICH-SCHWAIGER H, WERICH HG, GRUBER B, SCHWEIGER M, HIRSCH-KAUFFMANN M. Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. *Mutat Res* 1994; **316**: 37–48.
- [60] WIDEL M. Badania przydatności cytogenetycznego testu mikrojądrowego w ocenie promieniowrażliwości komórek nowotworowych i prawidłowych oraz jego znaczenia prognostycznego w radioterapii. Rozprawa o stopień doktora habilitowanego. Katowice, 2001.
- [61] WOJDA A, WITT M. Manifestation of aging at the cytogenetic level. *J Appl Genet* 2003; **44**: 383–399.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.10.2003 r.

Przyjęto: 08.01.2004 r.

ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,

e-mail: marialubka@wp.pl

NATURA I FUNKCJE CIAŁ CAJALA W ŚWIETLE NOWYCH BADAŃ

NATURE AND FUNCTIONS OF CAJAL BODIES IN THE LIGHT OF NEW RESEARCH

KRZYSZTOF ZIENKIEWICZ¹, JANUSZ NIEDOJADŁO²

¹Pracownia Biologii Rozwoju, ²Zakład Biologii Komórki,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Streszczenie. Ciała Cajala (ang. *Cajal bodies*, CBs) po raz pierwszy opisano 100 lat temu w neuronach ssaków. Obecnie wiadomo, że CB są wysoce konserwowaną strukturą występującą w komórkach somatycznych i generatywnych roślin oraz zwierząt. Białkiem znacznikowym CB jest koilina, fosfoproteina najprawdopodobniej odpowiadająca za umiejscowienie licznych makrocząstek w ciałach Cajala. Obecność małych jądrowych RNA (snRNA) w CB wskazuje na udział tej struktury w przestrzennej organizacji elementów biorących udział w składaniu pre-mRNA w komórce eukariotycznej. Dodatkowo, asocjacja z genami kodującymi snRNA, jak i obecność w CB czynników biorących udział w ich transkrypcji oraz dojrzewaniu silnie sugeruje, że ciała Cajala uczestniczą w biogenezie małych jądrowych RNA. Wykazano ponadto przestrzenny i funkcjonalny związek CB z jądrem. Prawdopodobnie ciała Cajala uczestniczą także w pewnych etapach ekspresji genów kodujących białka histonowe i małe jądrowe RNA (snoRNA).

Słowa kluczowe: ciało Cajala (CB), snRNP, składanie pre-mRNA.

Summary. Cajal bodies were first described 100 years ago in mammalian neurons. At the present moment, it is known that CB's are highly conserved structures found in somatic and generative cells of plants and animals. CB's marker protein is coilin, a phosphoprotein which is most probably responsible for location of many macromolecules in Cajal bodies. The presence of small nuclear RNAs (snRNAs) in CB is the evidence that this structure takes part in spatial organization of elements participate in pre-mRNA splicing. Additionally, the association with genes that code snRNA as well as the presence of their transcription and processing factors in CB strongly suggest that Cajal bodies participate in biogenesis of small nuclear RNAs (snRNAs). Furthermore there was shown the spatial and functional relationship of CB with nucleoli. Probably Cajal bodies also participate in some steps of histone and small nucleolar RNAs (snoRNAs) genes expression.

Key words: Cajal body (CB), snRNP, pre-mRNA splicing.

1. PRZESTRZENNO-FUNKCJONALNA ORGANIZACJA JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Wprowadzenie w latach dziewięćdziesiątych metod immunocytochemicznych oraz hybrydyzacji *in situ* pozwoliło na lokalizację w przestrzeni jądra komórkowego makrocząsteczek biorących udział w ekspresji genów. Metody te umożliwiły nie tylko lokalizację określonych sekwencji DNA, ale także różnych typów RNA oraz białek związanych z kolejnymi etapami transkrypcji, dojrzewania i transportu RNA do cytoplazmy.

Badania z zastosowaniem wspomnianych metod potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, że chromosomy nie są rozmieszczone w jądrze interfazowym w sposób przypadkowy [20]. Struktury te, zajmują w jądrze komórkowym wyodrębnione przestrzenie oddzielone od siebie „kanałami interchromatynowymi” [106].

Nielosową pozycję w jądrze zajmują także makrocząsteczki uczestniczące w procesie dojrzewania pierwotnego transkryptu. Wyniki badań immunofluorescencyjnych, przeprowadzonych przez Spector [91] na początku lat dziewięćdziesiątych, wykazały, że w jądrach komórek CHO 400 białka Sm tworzą od 20 do 50 wysepek (ang. *speckles*). Dalsze badania prowadzone tą samą techniką, ale na innych typach komórek ssaków potwierdziły, że nie tylko białka Sm [45], ale także czynnik splicingowy SC-35 [46] oraz małe jądrowe RNA (snRNA) mające na 5' końcu kapturek trimetylowy (2,2,7- trimetylguanozynę) [55,75], tworzą w jądrze „wzorzec wysepkowy”. Technika hybrydyzacji *in situ* z użyciem sond molekularnych ujawniono, że wśród snRNA tworzących wysepki, występują wszystkie klasy snRNA biorące udział w procesie składania pre-mRNA (tj. U1, U2, U4/U6 oraz U5 snRNA) [15].

Nagromadzenie danych wykazujących, że zarówno chromosomy, jak i różne typy RNA oraz białka uczestniczące w procesie transkrypcji i dojrzewania RNA zlokalizowane są w jądrze w sposób nielosowy, doprowadziło do sformułowania idei domen jądrowych [92,93]. Termin „domeny jądrowe” zastosowano dla wyrażenia funkcjonalno-przestrzennej organizacji ekspresji genów w komórce [17,95].

W tej funkcjonalno-przestrzennej organizacji ekspresji genów szczególnie miejsce zajmuje etap dojrzewania pierwotnego transkryptu, obejmujący między innymi składanie pre-mRNA, określane powszechnie angielskim terminem „*splicing*”. W procesie tym uczestniczą liczne białka oraz kilka klas małych jądrowych RNA, które stanowią elementy złożonego „systemu splicingowego”. Częsteczki biorące udział w składaniu pre-mRNA podlegają dynamicznym procesom: montażu, demontażu i magazynowania [103]. Wielość cząsteczek uczestniczących w procesie składania pre-mRNA i dynamika zmian, jakim podlegają, przekłada się na zróżnicowanie strukturalne domen jądrowych, w których te makrocząsteczki są zlokalizowane. Dotychczas stwierdzono, że w proces składania pre-mRNA zaangażowane są takie domeny, jak: włókienka perichromatynowe, będące strukturalnym wyrazem procesu transkrypcji RNA [25], skupienia ziarnistości interchromatynowych, znane także jako „*speckles*” bogate w czynnik splicingowy SC-35 [46] oraz jedna z kategorii ciał jądrowych znanych powszechnie pod nazwą „*coiled body*” [32,57].

2. CIAŁA CAJALA

Termin „*coiled body*” (CB) pochodzi z obserwacji prowadzonych przy użyciu mikroskopu elektronowego, które ujawniły, że opisywane struktury jądrowe utworzone są z „kłębuszkowato” zwiniętych włókien, przypominających kłębek (ang. *coil* – zwinięcie, zwitek) [58]. W literaturze polskojęzycznej możemy spotkać dwa terminy dotyczące tego typu ciał jądrowych: ciała zwinięte [3,44] lub ciała kłębuszkowate [90]. W szeroko prowadzonych badaniach nad strukturą i funkcją jądra komórkowego wielokrotnie opisywano ten typ ciał jądrowych, którym nadawano różnorodne nazwy. I tak, w oocytach płazów struktury odpowiadające CB przyjęto nazywać sferami [29], a podobne struktury w oocytach owadów nazwano *Binnenkörper* [31]. Ostatnio, dla określenia tych ciał coraz bardziej upowszechnia się termin „*Cajal body*” (CB) [31]. Nazwa ta wiąże się z nazwiskiem hiszpańskiego cytologa Santiago Ramon’y Cajala, który ponad sto lat temu po raz pierwszy opisał tę kategorię struktur jądrowych w komórkach nerwowych szczura [14].

Niezwykle ważnym etapem w badaniach CB było odkrycie białka znacznikowego tych struktur – koiliny [74] (ryc. 1). Zastosowanie metod immunocytochemicznych i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* dla jednoczesnej lokalizacji koiliny oraz innych antygenów jądrowych wykazało, że w ciałach Cajala zlokalizowane są makrocząsteczki uczestniczące w wielu procesach metabolizmu jądra komórkowego. W CB wykryto m.in.:



RYCINA 1. a) Immunolokalizacja p80-koiliny w komórkach HeLa przy użyciu serum autoimmunologicznego. Groty strzałek wskazują ziarna złota świadczące o obecności koiliny. Strzałka – ciało Cajala (x 24900). b) Lokalizacja p80-koiliny w ciałach Cajala przy użyciu oczyszczonego przeciwciała. Na zdjęciu dobrze widoczna struktura CB, utworzona z kłębkowato zwiniętych włókien. Groty strzałek wskazują ziarna złota (x 65800, za zgodą autora, Raska i wsp. 1991).

- cząsteczki związane z metabolizmem rRNA: fibrylarynę [73], U3 snoRNA [32], U8 snoRNA [32];
- czynniki zaangażowane w proces transkrypcji i dojrzewania pre-mRNA: polimerazę II RNA [78], białka TBP (białka wiążące się do sekwencji promotora TATA) [78], czynniki transkrypcyjne TFIIF, TFIIH i TFIIS [36,88], czynnik elongacji transkrypcji ELL i EAF1 (czynnik powiązany z ELL) [71], białko PTF (wiążące się do sekwencji PSF, która jest elementem promotora genów snRNA) [72], PKA (cAMP-zależna kinaza białkowa) [96], splicingowe małe jądrowe RNA (snRNA) [15], SMN (białko przeżywalności motoneuronów) [49], scaRNA (małe jądrowe snRNA specyficzne dla Cajal body) [22];
- czynniki biorące udział w transkrypcji i dojrzewaniu transkryptów genów histonowych: białko p220/NPAT aktywujące transkrypcję genów histonowych [53], U7 snoRNA [28], białko SLBP (ang. *stem-loop binding protein*) [1];
- czynniki odpowiedzialne za regulację cyklu komórkowego: cyklinę E/cdk [47],
- inne białka: topoizomerazę I [74], onkoproteinę MEQ [48], laminę A [63], telomerazę RNA [51], profilinę [83].

Taki zestaw makrocząsteczek dowodzi wielofunkcyjności ciała Cajala, jednakże większość prowadzonych obecnie badań koncentruje się na udziale tych struktur w organizacji komórkowego „systemu splicingowego”.

3. KOILINA

Pierwsze doniesienia na temat koiliny pochodzą z początku lat dziewięćdziesiątych, kiedy wykazano, że przeciwciała z surowic osób cierpiących na choroby reumatyczne (pierwotny zespół Sjögrena) wybiórczo znakują ciała Cajala. Okazało się, że surowice te rozpoznają białko o masie 80 kDa występujące w CB [74], które nazwano p80 bądź od miejsca jego lokalizacji – koiliną. Pomimo że ciała Cajala nie występują w każdym typie komórek, koilina była identyfikowana we wszystkich tkankach zarówno embrionalnych, jak i pochodzących od dorosłych osobników [97]. Gen kodujący koilinę został sklonowany i zsekwencjonowany [32].

Ludzka koilina jest fosfoproteiną składającą się z 576 aminokwasów, w której fosforylowane są reszty serynowe [10, 16]. Podczas mitozy koilina jest dodatkowo fosforylowana przynajmniej w dwóch miejscach [16]. Stan ufosforylowania koiliny wydaje się mieć wpływ na dystrybucję tego białka, a tym samym na formowanie ciała Cajala. Zahamowanie defosforylacji koiliny bądź usunięcie z niej seryny z pozycji 202 powoduje rozproszenie CB i akumulację koiliny w jąderku [52, 84].

Koilina ma sygnał lokalizacji jądrowej (sekwencja NLS), który podzielony jest na dwa obszary obejmujące aminokwasy od 107 do 112 i od 181 do 190 [10]. W koilinie wykryto także obecność tzw. „ukrytej” (z ang. *cryptic*) sekwencji odpowiedzialnej za przejściową lokalizację w jąderku (sekwencja NoLS). Sekwencja ta rozciąga się od

107 do 198 aminokwasu, a jej funkcjonowanie wydaje się zależeć od stanu ufosforylowania koiliny [38].

Koilina jest białkiem wysoce konserwowanym. Ostatnio wykazano jednakże, iż dystrybucja mysiej, ludzkiej i płaziej koiliny w komórkach HeLa transfekowanych odpowiednim plazmidem zawierającym GFP (z ang. *green fluorescent protein*) jest różna [82]. Jedynym jak dotąd znanym homologiem koiliny jest białko SPH-1 z oocytów płazów [99]. Końce N i C tego białka wykazują ponad 50% podobieństwo do ludzkiej koiliny. Próby lokalizacji koiliny podjęto również w komórkach roślin [7, 21, 94, 64, 13]. Okazało się, że większość przeciwciał do zwierzęcej koiliny nie wykazuje specyficzności względem tego białka u roślin. Jednakże techniką *Western blot* ujawniono, że ludzkie serum skierowane przeciwko koilinie wiąże się do białka roślinnego o masie ok 80 kD [7]. Pewne podobieństwo do C-końcowej domeny koiliny zwierzęcej odkryto w genomie *Arabidopsis thaliana* (AC007357). Zidentyfikowana otwarta ramka odczytu (z ang. *open reading frame* – ORF) ma konserwowane sekwencje aminokwasów w porównaniu z koiliną zwierzęcą, co wskazuje, że białko to może być jej roślinnym odpowiednikiem bądź polipeptydem należącym do tej samej rodziny [6].

Badania N-końcowej domeny koiliny oraz białka SPH-1 wykazały, że ten fragment peptydu odpowiada m.in za wiązanie z jednoniciowym DNA, poli(G) i poli(U) RNA oraz asocjację z Nopp 140, który jest płazim odpowiednikiem fibrylaryny [4, 40]. N-końcowa domena koiliny odpowiada również za lokalizację tego białka w CB [10, 38]. Znacznie mniej wiadomo na temat funkcji C-końca koiliny. Ostatnio wykazano, że domena ta może regulować liczbę CB w jądrze. W komórkach, które transformowano plazmidem kodującym C-końcową domenę koiliny połączoną z GFP, obserwowano wzrost liczby CB, któremu towarzyszyło obniżenie puli nukleoplazmatycznej tego białka [82]. Wydaje się również, że fosforylacja bądź sekwencje występujące w C-końcowej domenie odpowiadają za wiązanie koiliny z innymi białkami [82].

Koilina wykazuje zdolność do oligomeryzacji. Wydaje się, że za tę cechę koiliny odpowiada N-końcowa sekwencja tego białka [38]. Zdolność do oligomeryzacji wykazują również białka znacznikowe innych typów ciał jądrowych, np. PML, gems [41, 50].

Prowadzone przez ostatnie 10 lat intensywne badania dotyczące charakterystyki białka oraz genu koiliny nie wyjaśniły do końca jej funkcji. Obecnie wiadomo, że koilina jest białkiem dynamicznym, przemieszczającym się pomiędzy jądrem i cytoplazmą oraz CB i nukleoplazmą [5], które prawdopodobnie bierze udział w skupianiu innych makrocząsteczek w CB. Wskazują na to wyniki badań wykazujące obecność w koilinie symetrycznych dimetyloarginin (domeny RG), które odpowiadają za wiązanie się z białkiem SMN. Inhibicja metylacji koiliny, a także mutacje w domenie RG obniżają jej zdolność do wiązania z SMN oraz powodują wzrost ilości ciał typu gems w jądrze [11, 39]. Homozygotyczne mysie mutanty pozbawione 85% genu koiliny wykazywały normalną żywotność i płodność [98]. W jądrach tych zwierząt obserwowano dwa typy pozająderekowych ciał jądrowych, które rozmiarem i lokalizacją przypominają CB. Jedna kategoria tych struktur zawiera fibrylarynę i U3 snoRNA, natomiast druga scaRNA (*Cajal body-specific snRNA*, patrz rozdz. 4.3) i Sm snRNA [42]. Występowanie w komórkach pozbawionych koiliny takiego rozdziału molekuł (występujących zwykle

razem w CB) świadczy, że koilina jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za jednoczesne występowanie elementów jąderkowych i związanych ze składaniem pre-mRNA w ciałach Cajala.

4. UDZIAŁ CIAŁ CAJALA W PROCESACH JĄDROWYCH

Wprowadzenie białek fuzyjnych zawierających GFP (ang. *green fluorescent protein*) pozwoliło na śledzenie przemieszczania się i dystrybucji białek zlokalizowanych w ciałach Cajala. Istotnym etapem w badaniach dotyczących funkcji CB było wykazanie, że struktura ta asocjuje z określonymi sekwencjami DNA oraz innymi domenami jądroowymi. Już pierwsze badania ujawniały przestrzenny związek CB z jąderkiem. Ostatnio wykazano asocjację CB z takimi ciałami jądroowymi jak: *gems* – zawierającymi białko SMN, biorące udział w montażu snRNP oraz *cleavage body*, które zawiera cząsteczki biorące udział w dojrzewaniu końca 3' pre-mRNA histonowego: CstF64 (ang. *cleavage stimulation factor*) oraz CPSF100 (ang. *cleavage and polyadenylation specificity factor*). Badania prowadzone na oocytach płazów, a później na ludzkich liniach komórkowych ujawniły także nielosową asocjację CB z genami kodującymi histony. Również geny kodujące snRNA i snoRNA wykazują przestrzenny związek z CB. Dotychczasowe dane pozwoliły ustalić, że ciała Cajala związane są z:

- ◆ transkrypcją i dojrzewaniem transkryptów genów kodujących białka histonowe (patrz rozdz. 4.1)
- ◆ metabolizmem jąderka, w tym z transkrypcją i dojrzewaniem snoRNA; CB może także brać udział w transporcie makrocząsteczek pomiędzy cytoplazmą/nukleoplazmą a jąderkiem (patrz rozdz. 4.2)
- ◆ biogenezą snRNA, w tym transkrypcją oraz jego późniejszymi modyfikacjami (patrz rozdz. 4.3)

Dodatkowo badania prowadzone na oocytach płazów i owadów wykazały, że CB jest miejscem montażu kompleksów transkrypcyjnych dla polimerazy I, II oraz III RNA (patrz rozdz. 6).

4.1. Związek ciał Cajala z ekspresją genów kodujących białka histonów

Pierwsze doniesienia dotyczące przestrzennego związku ciał Cajala z genami histonowymi pochodziły z badań prowadzonych na oocytach płazów. Technika hybrydyzacji *in situ* stwierdziła występowanie asocjacji pomiędzy tandemowo ułożonymi genami histonowymi a snurposomami C (patrz rozdz. 6), które stanowią odpowiednik somatycznych CB [32]. Obecność w snurposomach C czynników niezbędnych podczas dojrzewania transkryptów histonowych, takich jak: U7 snRNA oraz białka SLBP (ang. *stem-loop binding protein*) wydaje się wskazywać, że związek ten ma charakter funkcjonalny [32, 1].

Używając sond molekularnych komplementarnych do sekwencji genów histonowych człowieka (znajdujących się na chromosomie I i 6), wykazano również przestrzenny

związek tych genów z ciałami Cajala w komórkach HeLa-ATCC. W około 40% jąder co najmniej jedno CB okazało się być zasocjowane z genami kodującymi białka histonowe [28]. Asocjacja ta dotyczy genów histonów rdzeniowych, których transkrypcja jest zależna od cyklu komórkowego i znacznie wzrasta na początku fazy S [23]. W ciałach Cajala zlokalizowano też cyklinę E oraz kinazę białkową 2 zależną od cykliny (CDK 2), których akumulacja w CB przypada na fazę S [47]. Stwierdzono ponadto, że cyklina E bierze udział w aktywacji białka p220/NPAT (również występującego w CB) będącego aktywatorem transkrypcji genów histonowych [53, 102].

Badania Shopland i wsp. [81] ujawniły, że nie wszystkie aktywne transkrypcyjnie geny histonowe są zasocjowane z ciałami Cajala. Wskazuje to, iż ich związek z CB (które zawierają czynniki wymagane podczas transkrypcji i dojrzewania histonowego RNA) jest konieczny jedynie do zainicjowania procesu transkrypcji i/lub zwiększenia poziomu ekspresji tych genów. Stąd sugeruje się, że CB mogą być strukturami biorącymi udział w procesie regulacji ekspresji genów histonowych. Ideę tę wydaje się popierać pozytywna korelacja pomiędzy liczbą CB zasocjowanych z genami histonowymi a intensywnością transkrypcji tychże genów w linii komórek HeLa S3.

Zaproponowano także, że formowanie CB może zachodzić pod wpływem zwiększonej aktywności genów histonowych, prawdopodobnie przez wzrost stężenia czynników wymaganych do transkrypcji i dojrzewania histonowego pre-mRNA [81]. Wskazuje na to wzrost liczby CB pomiędzy fazą G1 i S oraz spadek w fazie G2, co odpowiada wzorcowi aktywności transkrypcyjnej genów histonowych. Pozostaje to w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami o formowaniu struktur, przypominających morfologią i składem molekularnym ciała Cajala w odpowiedzi na wzrost stężenia U7 snRNA na terenie jądra komórkowego [100].

4.2. Związek ciał Cajala z metabolizmem jąderka

Liczne obserwacje prowadzone przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego wykazywały częsty przestrzenny związek ciał Cajala z jąderkiem w komórkach roślin i zwierząt, na przykład w komórkach merystematycznych korzeni roślin [19, 12, 104] i komórkach wątroby hibernowanych zwierząt [54]. Niekiedy CB obecne były w masie jąderka, co obserwowano w komórkach raka sutka człowieka [65]. Badania z użyciem białka fuzyjnego U2B-GFP wykazały dynamiczny charakter tych związków. Stwierdzono, że ciała Cajala przemieszczają się z peryferycznych obszarów jądra do jąderka jak również w obrębie samego jąderka [13]. Na funkcjonalny związek pomiędzy jąderkiem i CB wskazują m.in. doświadczenia prowadzone na komórkach traktowanych uprzednio kwasem okaidowym, który jest inhibitorem aktywności fosfataz serynowych i treoninowych [13, 52]. W 70% badanych komórek doszło do akumulacji koiliny i białka SmE (jedno z siedmiu białek wchodzących w skład kompleksu Sm) w jąderku. CB może zatem brać udział w transporcie molekuł pomiędzy cytoplazmą/nukleoplazmą a jąderkiem, który to proces prawdopodobnie jest regulowany przez fosforylację.

Pomimo braku w CB rRNA [16], numatryny, nukleoliny i polimerazy I RNA [32] struktura ta jest związana z metabolizmem jąderka. Wśród białek występujących w ciałach Cajala najwcześniej techniką Ag-NOR zidentyfikowano białka jąderkowe [80]. Następnie

wykazano, że CB bogate są w białka: Nopp140, rybosomalne białko S6 oraz topoiizomerazę I [32]. W ciałach Cajala zlokalizowano także małe jąderkowe RNP, takie jak U3 i U8 snoRNA, niezbędne do posttranskrypcyjnych modyfikacji pre-rRNA [57].

Wydaje się również, że podobnie jak to ma miejsce w przypadku genów histonowych oraz snRNA (patrz rozdz. 4.3), ciała Cajala mogą brać udział w regulacji ekspresji genów kodujących małe jąderkowe RNA. Ciała Cajala są często zasocjowane z genami dla U3 snoRNA [35], jak również z genami, których introny zawierają snoRNA [79]. Wśród tych ostatnich, najwyższy procent asocjacji (19%) wykazuje gen UHG, który w swoich intronach zawiera osiem (U22, U25-U31) różnych snoRNA [101].

Ostatnie wyniki badań wskazują, że CB może brać także udział w pewnych etapach dojrzewania snoRNA. Po iniekcji fluorescencyjnie znakowanych U3 i U8 snoRNA do jąder oocytów płazów pojawiają się one niemal jednocześnie na terenie jąderka i CB, po czym poziom znakowania na terenie ciał Cajala stopniowo maleje, a wzrasta jedynie w jąderku [62]. Wyniki badań Verheggen i wsp. [105] ujawniły, że na obszarze CB zachodzi także łączenie U3 snoRNA z fibrylarną oraz hNop56 i hNop58, jak i hipermetylacja 5' końca U3 snoRNA.

4.3. Związek ciał Cajala z metabolizmem snRNP

Pomimo że ciała Cajala stanowią jedną z głównych domen komórkowego „systemu splicingowego”, nie są miejscem składania pre-mRNA. Dowodzi tego brak w CB czynnika splicingowego SC-35, heterogennego RNA oraz białka U2 AF⁶⁵, które bierze udział w połączeniu U2 snRNP z miejscem rozgałęzienia intronu (ang. *intron branch point*) [34]. Jednakże wysokie stężenie snRNA [7, 15] oraz białek SMN [18, 108] (patrz rozdz. 4.3.1) w ciałach Cajala wskazuje na związek tych struktur z metabolizmem snRNP.

Matera w 1998 r. [56] zaproponował tzw. „łosośową” teorię biogenezy snRNA, według której miejsca syntezy małych jądrowych RNA są zasocjowane z ciałami Cajala, a sama struktura może brać udział w regulacji tego procesu. Punktem wyjścia dla tej hipotezy były wyniki badań ujawniające przestrzenny związek genów U1 i U2 snRNA z CB [28, 86]. Wykazano, iż procent asocjacji w przypadku genu U2 snRNA zależy od typu komórek i może wynosić od 20 do 92% [86]. Dodatkowo na obszarze CB zlokalizowano polimerazę II RNA [36], białka wiążące się do sekwencji TATA oraz czynnik transkrypcyjny PTF, który bierze udział w aktywacji promotora genów snRNA [78]. Rezultaty powyższych badań wraz z danymi ujawniającymi obecność włączonej bromourydyny (BrUTP) na peryferiach CB sugerują związek ciał Cajala z transkrypcją genów snRNA [78]. Po transkrypcji snRNA transportowany jest do cytoplazmy, gdzie wiąże się z białkami Sm, a koniec 5' ulega hipermetylacji [103]. Następnie powraca do jądra i przynajmniej pewna jego część kierowana jest do miejsc związanych z biogenezą, czyli do ciał Cajala. Biogeneza snRNA przypomina zatem drogę, jaką musi pokonać łośoś podczas swojego życia i sugeruje, że regulacja procesu transkrypcji małych jądrowych RNA może się odbywać na zasadzie sprzężenia zwrotnego [56].

Obecnie wiadomo, że CB jest ważną domeną uczestniczącą w procesie dojrzewania snRNP. Ma to miejsce prawdopodobnie tuż po transkrypcji, na co wskazuje obecność pre-U2 snRNA na peryferiach CB [87] jak również po powrocie snRNA z cytoplazmy

do jądra. Badania z użyciem fuzyjnych białek GFP/YFP-Sm B, D1 oraz E wykazały, iż powracający z cytoplazmy snRNP najpierw pojawia się na terenie ciał Cajala i jąderka a dopiero później w „*speckles*” (które reprezentują skupiska ziarnistości interchromatynowych) [85]. Skłania to do rozpatrywania CB jako struktury biorącej udział w pewnych etapach modyfikacji i wewnątrzjądrowym transporcie snRNA.

Jednak dopiero ostatnie, niezwykle spektakularne, wyniki Darzaq i wsp. [22] dowodzą udziału tych struktur w jądrowej fazie dojrzewania snRNP. Autorzy ujawnili obecność nowej klasy małych jądrowych RNA, występujących wyłącznie na obszarze ciał Cajala, tzw. *Cajal body-specific snRNA* (scaRNA). Ten typ małych jądrowych RNA zawiera sekwencje C/D oraz H/ACA wiążące się odpowiednio do białek fibrylaryny i Gar-1 [26, 76]. Sekwencje te były pierwotnie opisywane u różnych snoRNA, gdzie C/D bierze udział w metylacji a H/ACA w pseudourydylacji rRNA. Uzyskane wyniki badań dostarczają pierwszych eksperymentalnych dowodów świadczących, że scaRNA pełnią funkcje w pseudourydylacji i 2'-0-metylacji snRNA, a procesy te zachodzą na terenie CB [42].

4.3.1. Gems – ciała jądrowe przestrzennie i funkcjonalnie związane z CB

Na udział ciał Cajala w metabolizmie snRNA wskazuje także obecność na terenie tej struktury bądź w bezpośrednim jej sąsiedztwie kompleksu białkowego SMN. W skład tego kompleksu wchodzi białko: SMN (ang. *survival of motor neurons protein*; białko przeżywalności neuronów ruchowych, znane również pod nazwą Gemin-1) oraz Gemin-2, 3, 4, 5 i wykryte ostatnio Gemin 6 [67, 69]. Kompleksowi SMN przypisuje się ważną rolę w cytoplazmatycznej fazie biogenezy cząsteczek snRNP. Stwierdzono bowiem, iż SMN może bezpośrednio łączyć się z białkami Sm i jest zaangażowane w specyficzne łączenie się tych białek z snRNA. W układzie *in vitro*, przy braku SMN, białka Sm wiążą się nie tylko do snRNA, ale także do 5.8S rRNA i tRNA [70].

Pierwsza komórkowa lokalizacja białka SMN ujawniła obecność jego jądrowych skupień w pobliżu ciał Cajala [49, 108]. Ilość, rozmiar oraz podobne zachowanie tych struktur pod wpływem szoku termicznego lub traktowania aktynomycyną D czyni je bliźniaczo podobnymi do ciał Cajala i stąd wywodzi się ich nazwa anglojęzyczna „*gems*” (ang. *gemini of coiled bodies*) [49]. Gemsy występują jako odrębne struktury w embrionalnych tkankach oraz w nielicznych liniach komórkowych (np. HeLa PV), podczas gdy w większości badanych tkanek dorosłych organizmów i liniach komórkowych gemsy kolokalizują z ciałami Cajala [49, 108].

Obecnie szeroko badany jest udział gemsów w jądrowych stadiach dojrzewania i recyklingu snRNP, a także ich związek z CB [27, 68, 69]. Badania *in vitro* z użyciem pozbawionego pierwszych 27 aminokwasów białka SMN Δ N27 wykazały, iż w transfekowanych komórkach następuje zahamowanie procesu składania pre-mRNA, natomiast *in vivo* obserwowano redystrybucję snRNP na terenie jądra objawiającą się ich akumulacją w silnie powiększonych ciałach Cajala [68].

5. CIAŁA CAJALA W KOMÓRKACH ROŚLIN

W komórkach roślin znane były od dawna struktury jądrowe przypominające morfologicznie ciała Cajala komórek zwierząt, choć określane różnymi terminami [77]. Termin „*coiled body*” w odniesieniu do komórek roślin użyli po raz pierwszy Moreno Diaz de la Espina i wsp. [59] opierając się głównie na podobieństwie ultrastrukturalnym ciał jądrowych komórek cebuli do CB komórek zwierząt. Dopiero w latach dziewięćdziesiątych dzięki zastosowaniu metod immunocytochemicznych wykazano, że ciała jądrowe występujące w komórkach merystematycznych grochu i mejocytach modrzewia, które ultrastrukturalnie przypominają CB komórek ssaków, zawierają także snRNA i koilinę [7, 89]. Jednakże w komórkach roślin miejscem nagromadzenia elementów systemu składania pre-mRNA są zarówno wolno występujące w nukleoplazmie CB, jak i przyjąderkowe ciała jądrowe, znane w literaturze dotyczącej komórek roślinnych pod nazwą „*nucleolus associated body*” (NAB) [19, 37, 104]. Badania z zastosowaniem GFP (*green fluorescent protein*) ujawniły ruch CB w obrębie komórki roślinnej i wyjaśniły, że wolne CB i NAB reprezentują różną lokalizację tej samej struktury [13]. Do czasu zidentyfikowania w NAB koiliny i snRNP strukturę tę opisywano jako kategorię ciał jądrowych różną od nukleoplazmatycznych CB.

W porównaniu z szeroko prowadzonymi badaniami u zwierząt, ciała Cajala w komórkach roślin opisano u stosunkowo niewielkiej liczby modeli badawczych.

CB obserwowano w:

- komórkach korzeni (komórkach włośnikowych i merystematycznych) roślin dwuliściennych [12, 19] i jednoliściennych [2, 21],
- komórkach merystematycznych liścieni grochu [43],
- zarodkach kukurydzy [37],
- mejocytach oliwki i modrzewia [66, 89],
- mikrosporach i pyłku rzepaku [94],
- kulturach komórkowych tytoniu BY-2 [13],

W mikrosporach modrzewia opisano ponadto występowanie dwustrefowych ciał, w których jedna strefa swoją ultrastrukturą oraz składem molekularnym (zawiera snRNP i fibrylarynę) odpowiada CB, a druga zawiera białka wykazujące duże powinowactwo do jonów srebra oraz Sm. Taki rozdział elementów biorących udział w składaniu pre-mRNA w obrębie tej struktury oraz pewne podobieństwa metaboliczne pomiędzy mikrosporą modrzewia i oocytami płazów pozwalają na porównywanie ciał dwustrefowych do płazich snurposomów (patrz rozdz. 6) [64].

Występowanie ciał Cajala nie tylko u zwierząt, ale także w komórkach somatycznych i generatywnych u roślin, wskazuje na wysoce konserwatywny charakter tych struktur. Dotychczasowe wyniki badań nie ujawniają także żadnych różnic w składzie molekularnym między CB u roślin i zwierząt, co przemawia za uniwersalną naturą i funkcją ciał Cajala w komórkach eukariota.

Model komórek roślinnych okazał się niezwykle dogodny dla prowadzenia badań nad przemieszczaniem się CB w jądrze komórkowym, a także nad zmianami w liczebności tych struktur. Badania z użyciem GFP ujawniły, że CB są strukturami

dynamicznymi przemieszczającymi się na obszarze całej nukleoplazmy oraz mającymi zdolność łączenia, a także podziału [13]. Natomiast liczba CB i ich lokalizacja w nukleoplazmie zależy od typu oraz aktywności metabolicznej komórki [2, 12].

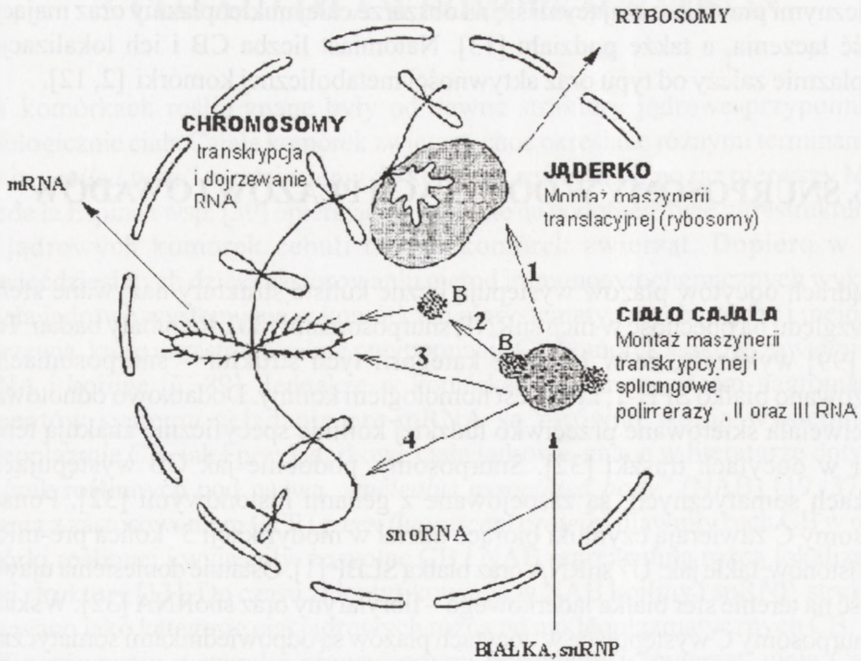
6. SNURPOSOMY W OOCYTACH PŁAZÓW I OWADÓW

W jądrach oocytów płazów występują liczne kuliste struktury nazywane sferami lub ze względu na obecność w nich snRNP, snurposomami [30]. Rezultaty badań Tuma i wsp. [99] wykazały, że w jednej z kategorii tych struktur – snurposomach C, zlokalizowano białko SPH-1, które jest homologiem koiliny. Dodatkowo odnotowano, iż przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej koiline specyficznie znakują ten typ struktur w oocytach traszki [32]. Snurposomy, podobnie jak CB występujące w komórkach somatycznych, są zasocjowane z genami histonowymi [32]. Ponadto, snurposomy C zawierają czynniki biorące udział w modyfikacji 3' końca pre-mRNA białek histonów, takie jak: U7 snRNA oraz białka SLBP [1]. Ostatnie doniesienia ujawniły obecność na terenie sfer białka jąderkowego – fibrylaryny oraz snoRNA [32]. Wskazuje to, że snurposomy C występujące w oocytach płazów są odpowiednikami somatycznych ciał Cajala. Warto zaznaczyć, że w pewnych stadiach rozwojowych oocytu CB są połączone z jednym do kilku snurposomów B.

Ciała jądrowe zawierające białka jąderkowe, p80-koilinę oraz snRNP opisywane były także w oocytach owadów [8, 9]. Biliński i Kloc [8], na podstawie morfologii i molekularnego wyposażenia tych struktur wykazali, że inkluzje złożone ze sferycznego ciała i półsferycznej struktury występujące w jądrach dodatkowych (ang. *accessory nuclei* – AN) oocytów *Vespa germanica* stanowią homologi, odpowiednio, oocytarnych ciał Cajala i snurposomów B.

Intensywnie prowadzone badania, dotyczące składu molekularnego płazich ciał Cajala oraz zasocjowanych z nimi snurposomów B, wykazały rozdział elementów „systemu splicingowego” w obrębie tych struktur [32]. W snurposomach B zlokalizowano m.in. pięć typów snRNP biorących udział w składaniu pre-mRNA oraz białka SR, natomiast w CB (snurposomy C) poza tymi molekułami, występującymi w dużo mniejszym stężeniu niż w snurposomach B, zlokalizowano U7 snRNP, białka SLPB-1 oraz znaczną ilość białek Sm [31]. Ponieważ snurposomy są jedynymi, poza pętlami chromosomowymi, obszarami zawierającymi czynniki biorące udział w składaniu pre-mRNA w jądrach płazów, uważa się, że CB jest miejscem segregacji czynników splicingowych, które następnie wędrują do snurposomów B, a z nimi do miejsc syntezy RNA (ryc. 2).

Gall i wsp. [31] w powyższym modelu przedstawili udział CB oraz snurposomów B nie tylko w segregacji czynników biorących udział w składaniu pre-mRNA, ale także czynników transkrypcyjnych. Struktury te zawierają bowiem polimerazę II RNA oraz czynnik transkrypcyjny RNA-TFIIF [31]. Pierwsze wyniki dotyczące lokalizacji polimerazy II RNA w jądrach oocytów płazów ujawniły, że CB oraz zasocjowane z nimi snurposomy B zawierają różne formy polimerazy II RNA [33, 60]. Polimerazy te



RYCINA 2. Model udziału CB (snurposomów C) oraz snurposomów B w segregacji i montażu kompleksów transkrypcyjnych i splicingowych w oocytach płazów. Strzałka 1 wskazuje przepływ maszyneryi transkrypcyjnej oraz czynników związanych z dojrzewaniem RNA transkrybowanym przez polimerazę I RNA; strzałka 2 – przepływ elementów splicingowych do genów transkrybowanych przez polimerazę II (z udziałem snurposomów B); strzałka 3 – przepływ czynników transkrypcyjnych do genów obsługiwanych przez polimerazę II; strzałka 4 – przepływ maszyneryi transkrypcyjnej oraz czynników związanych z dojrzewaniem RNA transkrybowanym przez polimerazę III RNA; B – snurposomy B (za zgodą autora, zmieniony [Gall i wsp. 1999])

różniły się poziomem oraz miejscem fosforylacji. Sugerowało to, że czynniki transkrypcyjne, podobnie jak splicingowe, mogą przemieszczać się z CB do snurposomów B, a wraz z nimi do aktywnych transkrypcyjnie miejsc na chromosomach. W najnowszym doniesieniu autorzy przedstawiają jednakże dowody, że powszechnie stosowane przeciwciąło H5 (również użyte w badaniach płazich snurposomów) skierowane przeciwko aktywnej formie polimerazy II RNA wiąże się także do białek SR [24]. Wyniki te dokumentują brak jakiegokolwiek formy polimerazy II w snurposomach B. Model segregacji czynników transkrypcyjnych w CB, proponowany przez Galla, wydaje się ciągle aktualny, aczkolwiek transport tych makrocząsteczek do miejsc aktywnych transkrypcyjnie odbywa się bez udziału snurposomów B (ryc. 2).

CB płazów są przypuszczalnie również związane z maszyną transkrypcyjną obsługującą syntezę rRNA i tRNA, na co wskazuje obecność podjednostek polimerazy I i III oraz czynnika transkrypcyjnego TFIIA na obszarze tych struktur [31, 61].

ZAKOŃCZENIE

Intensywne badania prowadzone przez ostatnie 10 lat wykazały, że ciało Cajala jest prawdopodobnie wielofunkcyjną domeną jądrową. Ustalono, że CB jest związane z ekspresją genów kodujących białka histonowe, snRNA i snoRNA, metabolizmem jąderka a także bierze udział w montażu kompleksów transkrypcyjnych i czynników biorących udział w dojrzewaniu RNA – polimerazy I, II, III RNA. Niezwykle ważny wydaje się też związek CB z niektórymi jednostkami chorobowymi. I tak białko SMN, którego mutacje obserwuje się w rdzeniowym zaniku mięśni występuje na obszarze lub regionach zasocjowanych z CB. Ostatnio odnotowano także asocjację ciał Cajala z jądrowymi inkluzjami występującymi w pewnych chorobach neurodegradacyjnych [107].

Pomimo że CB może być związane z wieloma procesami jądrowymi, ostatnie wyniki, pochodzące z laboratoriów Kissa i Bertranda, otwierają nowy rozdział w badaniach nad CB, dostarczając eksperymentalnych dowodów na udział ciał Cajala w metylacji i pseudourydylacji snRNA, a także w montażu i metylacji końca 5' snoRNP. Zatem CB stanowią miejsce zachodzenia modyfikacji snRNA i snoRNA, które są niezbędne dla prawidłowego zachodzenia procesu składania pre-mRNA i dojrzewania pre-rRNA.

Podziękowania

Autorzy dziękują prof. dr hab. Alicji Górskiej-Brylass za długie i niezwykle stymulujące dyskusje dotyczące funkcji CB, które były pomocne przy pisaniu niniejszego artykułu oraz prof. dr hab. Elżbiecie Bednarskiej za wiele cennych wskazówek i uwag dotyczących powyższego tekstu.

LITERATURA

- [1] ABBOT J, MARZLUFT WF, GALL JG. The stem loop binding protein (SLBP1) is present in coiled bodies of the *Xenopus* germinal vesicle. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 487–499.
- [2] ACEVEDO R., SAMANIEGO R, MORENO DIAZ DE LA ESPINA S. Coiled bodies in nuclei from plant cells evolving from dormancy to proliferation. *Chromosoma* 2002; **110**: 559–569.
- [3] ADAMSKA M, BILIŃSKI SM. Domeny jądrowe zawierające snRNPs – struktura i aktualne poglądy na funkcje. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 93–102.
- [4] BELLINI M, GALL JG. Coilin can form a complex with the U7 small nuclear ribonucleoprotein. *Mol Biol Cell* 1998; **9**: 2987–3001.
- [5] BELLINI M, GALL JG. Coilin is a shuttling protein in *Xenopus* oocyte. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 3425–3434.
- [6] BELLINI M. Coilin, more than a molecular marker of the Cajal (coiled) body. *Bioessays* 2000; **22**: 861–867.
- [7] BEVEN AF, SIMPSON GG, BROWN JWS, SHAW PJ. The organization of spliceosomal components in nuclei of higher plants. *J Cell Sci* 1995; **108**: 509–518.
- [8] BILIŃSKI SM, KLOCM. Accesory nuclei revisited: the translocation of snRNPs from the germinal vesicle to the periphery of the future embryo. *Chromosoma* 2002; **111**: 62–68.
- [9] BOGOLYUBOV D, PARFENOV V. Immunogold localization of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing factors in *Tenebrio molitor* oocyte nuclei with special emphasis on karyosphere development. *Tissue Cell* 2001; **33**: 549–561.
- [10] BOHMANN K, FERREIRA JA, LAMOND AJ. Mutational analysis of p-80 coilin indicates of functional interaction between coiled bodies and nucleolus. *J Cell Biol* 1995; **131**: 817–831.

- [11] BOISVERT FM, COTE J, BOULANGER MC, CLEROUX P, BACHAND F, AUTEXIER C, RICHARD S. Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 2002; **159**: 957–969.
- [12] BOUNDOCK K, DOLAN L, SHAW PJ. Coiled body numbers in the *Arabidopsis* root epidermis are regulated by cell type, developmental stage and cell cycle parameters. *J Cell Sci* 1998; **111**: 3687–3694.
- [13] BOUNDOCK K, DOLAN L, SHAW PJ. The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 2297–2307.
- [14] CAJAL SRy. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab Lab Invest Biol (Madrid)* 1903; **2**: 129–221.
- [15] CARMO-FONSECA M, PEPPERKOK R, CARVALHO MT, LAMOND AJ. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* 1992; **117**: 1–14.
- [16] CARMO-FONSECA M, FERREIRA J, LAMOND AJ. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis-evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J Cell Biol* 1993; **120**: 841–852.
- [17] CARMO-FONSECA M, CUNHA C, CUSTODION N, CARVALHO C, JORDAN P, FERREIRA J, PARREIRA L. The topography of chromosomes and genes in the nucleus. *Exp Cell Res* 1996; **15**: 247–252.
- [18] CARVALHO T, ALMEIDA F, CALAPEZ A, LAFARGA M, BERCIANO MT, CARMO-FONSECA M. The spinal muscular atrophy disease gene product SMN. A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol* 1999; **147**: 715–728.
- [19] CHAMBERLAND H, LAFONTAINE JG. Localization of snRNP antigens in nucleolus associated bodies: study of plant interphase nuclei by confocal and electron microscopy. *Chromosoma* 1993; **102**: 220–227.
- [20] CREMER T, KRETH G, KOESTER H, FINK RH, HEINTZMANN R, CREMER M, SOLOVEI I, ZINK D, CREMER C. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000; **10**: 179–212.
- [21] CUI P, MORENO DIAZ DE LA ESPINA S. Sm and U2B'' proteins redistribute to different nuclear domains in dormant and proliferating onion cells. *Planta* 2003; **217**: 21–31.
- [22] DARZAQ X, JADY BE, VERHEGGEN C, KISS AM, BERTRAND E, KISS T. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J* 2002; **21**: 2746–2756.
- [23] DOMINSKI Z, MARZLUFF WF. Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* 1999; **239**: 1–14.
- [24] DOYLE O, CORDEN JL, MURPHY C, GALL JG. The distribution of RNA polymerase II largest subunit (RPB 1) in the *Xenopus* germinal vesicle. *J Struct Biol* 2002; **140**: 154–166.
- [25] FAKAN S, LESER G, MARTIN TE. Ultrastructural distribution of ribonucleoproteins as visualised by immunocytochemistry on thin sections. *J Cell Biol* 1984; **98**: 358–363.
- [26] FILIPOWICZ W, POGAČIĆ V. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 319–327.
- [27] FISHER U, LIU Q, DREYFUS G. The SMN-SIP1-complex has a essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 1997; **90**: 1023–1029.
- [28] FREY MR, MATERA AG. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5915–5919.
- [29] GALL JG. Lampbrush chromosomes from oocyte nuclei of the newt. *J Morphol* 1954; **94**: 283–352.
- [30] GALL JG. Spliceosomes and snurposomes. *Science* 1991; **252**: 1499–1500.
- [31] GALL JG, BELLINI M, WU Z, MURPHY C. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 4385–4402.
- [32] GALL JG. Cajal Bodies: The first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; **16**: 273–300.
- [33] GALL JG. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett* 2001; **498**: 164–167.
- [34] GAMA-CARVALHO M, KRAUSS RD, CHIANG L, VALCÁRCEL J, GREEN MR, CARMO-FONSECA M. Targeting of U2AF⁶⁵ to sites of splicing in the nucleus. *J Cell Biol* 1997; **137**: 975–987.
- [35] GAO L, FREY MR, MATERA AG. Human genes encoding U3snRNA associate with coiled bodies in interphase cells and are clustered on chromosome 17p11.2 in a complex inverted repeat structure. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 4740–4747.
- [36] GRANDE MA, VAN DER KRAAN J, DE JONG L, VAN DRIEL R. Nuclear distribution of transcription factors in relations to sites of transcription and RNA polymerase II. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1781–1791.
- [37] GULEMETOVA MJ, CHAMBERLAND H, GUGG S, PLANTE M, LAFONTAINE JG. Presence of small-nuclear-ribonucleoprotein-containing nuclear bodies in quiescent and early germinating *Zea mays* embryos. *Protoplasma* 1998; **202**: 192–201.

- [38] HEBERT MD, MATERA AG. Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 4159–4171.
- [39] HEBERT MD, PILLAI R, SHPARGEL KB, OSPINA JK, SCHUMPERLI D, MATERA AG. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev Cell* 2002; **3**: 329.
- [40] ISAAC C, YANG Y, MEIER VT. Nopp 140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J Cell Biol* 1998; **142**: 319–329.
- [41] ISHOV AM, SOTNIKOV AG, NEGOREV D, VLADIMIROVA OV, NEFF N, KAMITANI T, YEH ET, STRAUSS JF 3 rd, MAUL GG. PML is critical for ND 10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 1999; **147**: 221–234.
- [42] JADY BE, DARZACQ X, TUCKER KE, MATERA AG, BERTRAND E, KISS T. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J* 2003; **22**: 1878–1888.
- [43] JEANNE A, THIRY M, GOESSENS G. Identification of coiled body-like structures in meristematic cells of *Pisum sativum* cotyledonary buds. *Chromosoma* 1999; **108**:132–142
- [44] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L, Cytobiochemia. 1998; PWN Warszawa.
- [45] LAMOND AI, CARMO-FONSECA M. Localisation of splicing snRNPs in mammalian cells. *Mol Biol Rep* 1993; **18**: 127–133.
- [46] LAMOND AI, SPECTOR DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 605–612.
- [47] LIU J-L, HERBERT MD, YE Y, TEMPLETON DJ, KUNG H-J, MATERA AG. Cell cycle dependent localization of the CDK2-cyclin E complex in Cajal (coiled) bodies. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1543–1552.
- [48] LIU JL, KUNG HJ. Marek's disease herpesvirus transforming protein MEQ: a c-Jun analogue with an alternative life style. *Virus Genes* 2000; **21**: 51–64.
- [49] LIU Q, DREYFUSS G. A novel nuclear structure containing the survival of motoneurons protein. *EMBO J* 1996; **15**: 3555–3565.
- [50] LORSON CL, STRASSWIMMER J, YAO JM, BALEJA JD, HAHNEN E, WIRTH B, LE T, BURGHESE AH, ANDROPHY EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 1998; **19**: 63–66.
- [51] LUKOWIAK AA, NARAYANAN A, LI ZH, TERNS RM, TERNS MP. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* 2001; **7**: 1833–1844.
- [52] LYON CE, BOHMANN K, LAMOND AI. Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Exp Cell Res* 1997; **230**: 84–93.
- [53] MA T, VAN TINE BA, WEI Y, GARRET MD, NELSON D, ADAMS PD, WANG J, QIN J, CHOW LT, HARPER JW. Cell cycle-regulated phosphorylation of p220 (NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev* 2000; **14**: 2298–2313.
- [54] MALATESTA M, ZANCANARO C, MARTIN TE, CHAN EKL, AMALRIC F, FAKAN S. Is the coiled body involved in nucleolar functions? *Exp Cell Res* 1994; **211**: 415–419.
- [55] MATERA AG, WARD DC. Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J Cell Biol* 1993; **121**: 715–727.
- [56] MATERA AG. Of coiled bodies, gems, and salmon. *J Cell Biochem* 1998; **70**: 181–192.
- [57] MATERA AG. Nuclear bodies multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends in Cell Biol* 1999; **9**: 302–308.
- [58] MONNERON A, BERNHARD W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastr Res* 1969; **27**: 266–288.
- [59] MORENO DIAZ DE LA ESPINA S, SANCHEZ PINA A, RISUENO MC, MEDINA FJ, FERNANDEZ-GOMEZ ME. The role of plant coiled bodies in nuclear RNA metabolism. *Electron Microsc* 1980; **2**: 240–241.
- [60] MORGAN GT, DOYLE O, MURPHY C, GALL JG. RNA polymerase II in Cajal bodies of amphibian oocytes. *J Struct Biol* 2000; **129**: 258–268.
- [61] MURPHY C, WANG Z, ROEDER RG, GALL JG. RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 3466–3476.
- [62] NARAYANAN A, SPECKMANN W, TERNS R, TERNS MP. Role of the box C/D motif in localization of small nucleolar RNAs to coiled bodies and nucleoli. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 2131–2147.
- [63] NERI LM, RAYMOND Y, GIORDANO A, BORGATTI P, MARCHISIO M, CAPITANI S, MARTELLI AM. Spatial distribution of lamin A and B1 in the K562 cell nuclear matrix stabilized with metal ions. *J Cell Biochem* 1999; **75**: 36–45.
- [64] NIEDOJADŁO J, GÓRSKA-BRYLASS A. New type of snRNP containing nuclear bodies in plant cells. *Biol Cell* 2003; **5**: 303–310.

- [65] OCHS RL, STEIN TW, TAN EM. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *J Cell Sci* 1994; **107**: 385–399.
- [66] OLMEDILLA A, ALCHE JD, RODRIGUEZ-GARCIA MI. Nucleolar evolution and coiled bodies during meiotic prophase in *Olea europea*: differential localization of nucleic acids. *Eur J Cell Biol* 1997; **74**: 181–189.
- [67] PAUSHKIN S, GUBITZ AK, MASSENET S, DREYFUSS G. The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 305–312.
- [68] PELIZZONI L, KATAOKA N, CHARROUX B, DREYFUSS G. A novel function for SMN the spinal muscular atrophy disease gene product in pre-mRNA splicing. *Cell* 1998; **95**: 615–624.
- [69] PELLIZONI L, BACCON J, RAPPILBER J, MANN M, DREYFUSS G. Purification of native SMN complexes and identification of Gemin 6 as a novel component. *J Biol Chem* 2002; **277**: 7540–7545.
- [70] PELLIZONI L, YONG J, DREYFUSS G. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* 2002; **298**: 1775–1779.
- [71] POLAK PE, SIMONE F, KABERLEIN JJ, LUO RT, THIRMAN MJ. ELL and EAF1 are Cajal body components that are disrupted in MLL-ELL leukemia. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 1517–1528.
- [72] POMBO A, CUELLO P, SCHUL W, YOON JB, ROEDER RG, COOK PR, MURPHY S. Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally active nuclear domain rich in PTF, Oct 1 and PIKA antigens associated with specific chromosomes early in the cell cycle. *EMBO J* 1998; **16**, **17**: 1768–1778.
- [73] RAŠKA I, OCH RL, ANDRADE LE, CHAN EK, BURLINGAME R, PEEBLES C, GRUOL D, TAN EM. Association between the nucleolus and the coiled body. *J Struct Biol* 1990; **104**: 120–127.
- [74] RAŠKA I, ANDRADE LEC, OCHS RL, CHAN EKL, CHANG C-M. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp Cell Res* 1991; **195**: 27–37.
- [75] REUTER R, LEHNER CF, NIGG EA, LUHRMANN R. A monoclonal antibody specific for snRNPs U1 and U2. *FEBS Lett* 1986; **201**: 25–30.
- [76] RICHARD P, DARZACQ X, BERTRAND E, JADY BE, VERGHEGGEN C, KISS T. A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs. *EMBO J* 2003; **22**: 4283–4293.
- [77] RISUENO MC, MEDINA FJ. The nucleolar structure in the plant cells. *Serv. Edit. Universidad del Pais Vasco. Ed. Barbera-Guillem, E: Leioa-Vizcaya, Spain.* 1986; **7**: 87–89, 98–105.
- [78] SCHUL W, VAN DRIEL R, DE JONG L. Coiled bodies and U2 snRNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required for snRNA transcription. *Mol Biol Cell* 1998; **9**: 1025–1036.
- [79] SCHUL W, ADELAAR B, VAN DRIEL R, DE JONG L. Coiled bodies are predisposed to a spatial association with genes that contain snoRNA sequences in their introns. *J Cell Biochem* 1999; **75**: 393–403.
- [80] SEITE R, PEBUSQE M-J, VIO-CIGNA M. Agyrophilic proteins on coiled bodies in sympathetic neurons identified by Ag-NOR procedure. *Biol Cell* 1982; **46**: 97–100.
- [81] SHOPLAND LS, BYRON M, STEIN JL, LIAN JB, STEIN GS, LAWRENCE JB. Replication-dependent histone gene expression is related to Cajal body (CB) association but does not require sustained CB contact. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 565–576.
- [82] SHPARGEL KB, OSPINA JK, TUCKER KE, MATERA AG, HEBERT MD. Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *J Cell Sci* 2003; **116**: 303–312.
- [83] SKARE P, KREIVI JP, BERGSTROM A, KARLSSON R. Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res* 2003; **286**: 12–21.
- [84] SLEEMAN J, LYON CE, PLATANI M, KREIVI JP, LAMOND AI. Dynamic interactions between splicing snRNP, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Exp Cell Res* 1998; **243**: 290–304.
- [85] SLEEMAN JE, LAMOND AI. Newly assembled snRNP associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr Biol* 1999; **9**: 1065–1074.
- [86] SMITH KP, CARTER KC, JHONSON CV, LAWRENCE JB. U2 i U1 snRNA gene loci associate with coiled bodies. *J Cell Biochem* 1995; **59**: 473–485.
- [87] SMITH KP, LAWRENCE JB. Interactions of U2 gene loci and their nuclear transcripts with Cajal (coiled) bodies: evidence for PreU2 within Cajal bodies. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 2987–2998.
- [88] SMITH AJ, LING Y, MORGAN GT. Subnuclear localization and Cajal body targeting of transcription elongation factor TFIIS in amphibian oocytes. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 1255–1267.

- [89] SMOLIŃSKI DJ, GÓRSKA-BRYLASS A. Plant „coiled bodies” after in situ hybridization and immunocytochemical investigations. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**: suppl. 2: 90.
- [90] SMOLIŃSKI DJ, GÓRSKA-BRYLASS A. Liczne jądrowe ciała kłębuszkowate w profazowych mikrosporozytach modrzewia jako wskaźnik wzmożonych procesów dojrzewania RNA. Polish botany on the threshold of XXI century. (eds.) J. Miądlikowska 1998.
- [91] SPECTOR DL. Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 147–151.
- [92] SPECTOR DL, LANDON S, O'KEEFE RT. Organization of RNA polymerase I transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Biochem Soc Trans* 1993; **21**: 918–920.
- [93] SPECTOR DL. Nuclear domains. *J Cell Sci* 2001; **114**: 2891–2893.
- [94] STRAATMAN KR, SCHEL JH. Distribution of splicing proteins and putative coiled bodies during pollen development and androgenesis in *Brassica napus* L. *Protoplasma* 2001; **216**: 191–200.
- [95] STROUBOULIS J, WOLFFE AP. Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 1996; **109**: 1991–2000.
- [96] TRINCZEK B, ROBERT-NICOUD M, SCHWOCH G. In situ localization of cAMP-dependent protein kinases in nuclear and chromosomal substructures: relation to transcriptional activity. *Eur J Cell Biol* 1993; **60**: 196–202.
- [97] TUCKER KE, MASSELLO LK, GAO L, BARBER TJ, HEBERT MD, CHAN EK, MATERA AG. Structure and characterization of the murine p80 coilin gene, Coil. *J Struct Biol* 2000; **129**: 269–277.
- [98] TUCKER KE, BERCIANO MT, JACOBS EY, LePAGE DF, SHPARGEL KB, ROSSIRE JJ, CHAN EK, LAFARGA M, CONLON RA, MATERA AG. Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNP and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *J Cell Biol* 2001; **154**: 293–307.
- [99] TUMA RS, STOLK JA, ROTH MB. Identification and characterization of a sphere organelle protein. *J Cell Biol* 1993; **122**: 767–773.
- [100] TUMA RS, ROTH MB. Induction of coiled body-like structures in *Xenopus* oocytes by U7 snRNA. *Chromosoma* 1999; **108**: 337–344.
- [101] TYCOWSKI KT, SHU MD, STEITZ JA. A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. *Nature* 1996; **379**: 464–466.
- [102] WEI Y, JIN J, HARPER JW. The cyclin E/Cdk2 substrate and Cajal body component p220 (NPAT) activates histone transcription through a novel LisH-Like domain. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 3669–3680.
- [103] WILL CL, LUHRMANN R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 290–301.
- [104] WRÓBEL B, SMOLIŃSKI DJ. Coiled bodies in the meristematic cells of the root of *Lupinus luteus* L. *Biologia Plantarum* 2003; **46**: 223–232.
- [105] VERHEGGEN C, LAFONTAINE DL, SAMARSKY D, MOUAIKEL J, BLANCHARD JM, BORDONNE R, BERTRAND E. Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J* 2002; **21**: 2736–2745.
- [106] VISSER AE, JAUANIN F, FAKAN S, ATEN JA. High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci* 2000; **113**: 2585–2593.
- [107] YAMADA M, SATO T, SHIMOHATA T, HAYASHI S, IGARASHI S, TSUJI S, TAKAHASHI H. Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1785–1795.
- [108] YOUNG PJ, LE TT, DUNCKLEY M, NGUYEN TM, BURGHESE AH, MORRIS GE. Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp Cell Res* 2001; **265**: 252–261.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano 24.09.2003 r.

Przyjęto: 13.02.2004 r.

ul. Gagarina 9, 87–100 Toruń

e-mail: kzienk@biol.uni.torun.pl

CHAPTER I

THE EARLY HISTORY OF THE UNITED STATES

The first European settlers in North America were the Spanish, who arrived in 1492. They were followed by the French, the Dutch, and the English. The English colonies were founded in 1607, and the first American Revolution was fought in 1776. The United States was declared independent on September 17, 1787, and the Constitution was signed on September 17, 1787.

The United States has a long and rich history. It has been a land of freedom and opportunity for many people. It has been a land of progress and innovation. It has been a land of peace and justice. It has been a land of hope and dreams. It has been a land of love and compassion. It has been a land of courage and sacrifice. It has been a land of faith and belief. It has been a land of strength and power. It has been a land of wisdom and knowledge. It has been a land of beauty and grace. It has been a land of glory and honor. It has been a land of peace and harmony. It has been a land of love and unity. It has been a land of hope and dreams. It has been a land of faith and belief. It has been a land of strength and power. It has been a land of wisdom and knowledge. It has been a land of beauty and grace. It has been a land of glory and honor. It has been a land of peace and harmony. It has been a land of love and unity.

BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO MOLEKULARNE *PERPETUUM MOBILE**

HEAT SHOCK PROTEINS – MOLECULAR *PERPETUUM MOBILE*

Joanna CYMERYŚ **, Marek NIEMIAŁTOWSKI

Pracownia Immunologii, Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii,
Katedra Nauk Przeklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Streszczenie: Białka szoku cieplnego [ang. *heat shock proteins, HSP*] należą do białek o najbardziej konserwatywnej sekwencji aminokwasowej w biosferze. Odgrywają istotną rolę we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, chroniąc je przed szkodliwymi konsekwencjami metabolicznymi i środowiskowymi. Spełniają rolę czynników opiekuńczych dla innych białek, biorą udział w fałdowaniu i rozplataniu łańcuchów polipeptydowych, oligomeryzacji, translokacji oraz degradacji. HSP należą do kilku rodzin, gdzie zostały sklasyfikowane w zależności od ich masy cząsteczkowej, m.in: HSP100 (rodzina 100-kDa), HSP90 (rodzina 90-kDa), HSP70 (rodzina 70-kDa), HSP60 (rodzina 60-kDa) oraz HSP20 (18–30 kDa). Ekspresję genów kodujących HSP indukuje ekspozycja komórek na działanie wysokiej temperatury oraz innych egzogennych i endogennych czynników, nazywanych stresorami molekularnymi, którymi mogą być: analogi aminokwasów, metale ciężkie, alkohole, wolne rodniki, wiele trucizn metabolicznych, zakażenie wirusowe i bakteryjne, niedobór glukozy, cytokiny, promieniowanie UV i inne. W tym artykule dokonano ogólnej charakterystyki HSP zwracając uwagę na ich szczególnie udział w modyfikowaniu odpowiedzi immunologicznej oraz możliwy związek z wieloma stanami chorobowymi.

Słowa kluczowe: białka szoku cieplnego, odporność, apoptoza.

Summary: Heat Shock Proteins [HSP, *molecular chaperones*] are among the most highly conserved proteins in the biosphere and play very important role in eukaryotic and prokaryotic cells, providing them with protection from environmental factors and guaranting a steady state of cell metabolism. HSPs are defined as a group of unrelated proteins that mediate the correct folding, assembly, reparation, translocation across membranes and degradation of other proteins and simultaneously are not their functional components. HSPs can be divided into six subfamilies according to their molecular weights:

* Praca wykonana w ramach grantu niskonakładowego KBN nr 6 P06K01121 (dla J. Cymeryś) oraz «Subsydium dla uczonych» nr 10/2000 (dla M. Niemiałtowskiego) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP).

** Uczestniczka dziennego studium doktoranckiego «mikrobiologia i immunologia» przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW oraz stypendystka FNP w ramach w/w subsydium FNP.

the large Hsp100 family, intermediate HSP90, 70, 60, 40 families and the small HSPs of 18–30 kDa. Expression of most HSPs is induced by temperature and other molecular stressors including nutrient deprivation, oxygen radicals, metabolic deterioration, viral and bacterial infections, cytokines and UV irradiation. This article presents general characteristics of HSPs and their role in modulating both inflammatory and immune response, including possible connection with many diseases.

Key words: heat shock proteins, immunity, apoptosis.

Wykaz stosowanych skrótów: **AIF** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę; **Apaf-1** (*apoptotic protease activating factor*) – czynnik uczestniczący w aktywacji proteaz apoptotycznych; **APC** (*antigen presenting cell*) – komórka prezentująca antygen; **BAX, BIK, BAK, BAD** – białka proapoptotyczne; **BCL-2, BCL-X_L** – białka antyapoptotyczne; **BCL-2/BAX** – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy; **CTL** (*cytotoxic T lymphocytes*) – cytotoksyczne limfocyty T; **ER** (*endoplasmatic reticulum*) – retikulum endoplazmatyczne; **FAS** – antygen powierzchniowy, jeden z receptorów rodziny TNF; **FASL** – ligand receptora FAS; **GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; **HHV-1** (*human herpes virus type 1*) – wirus opryszczki typu 1; **HSE** (*heat shock element*) – element szoku cieplnego; **HSF** (*heat shock factor*) – czynnik szoku cieplnego; **HSP** (*heat shock protein*) – białka szoku cieplnego; **HTLV-I** (*human T-cell lymphotropic virus type 1*) – T-komórkowy wirus limfotropowy typu 1; **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny kompleks zgodności tkankowej; **NK** (*natural killer*) – naturalna komórka cytotoksyczna NK; **NLS** (*nuclear localisation signal*) – sygnał lokalizacji jądrowej; **p53mut** – białko kodowane przez geny supresorowe *p53*, mutant; **p53wt** – białko kodowane przez geny supresorowe *p53*, dziki typ; **PCD** (*programmed cell death*) – programowana śmierć komórki; **PIGs** (*p53-induced genes*) – geny indukowane przez *p53*; **PrP^c** – białko prionowe forma prawidłowa; **PrPⁱ** – białko prionowe forma pośrednia; **PrP^{Sc}** – białko prionowe forma zakaźna; **ROS** (*reactive oxygen species*) – wolne rodniki tlenowe; **SAPKs/JNKs** (*SAPK-stress activated protein kinase; JNK-C-jun N-terminal Kinase*); **sHSP** (*small heat shock protein*) – niskocząsteczkowe białka szoku cieplnego; **TAP** (*transporters associated with antigen processing*) – białko transportujące związane z obróbką antygeny; **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu; **TRAIL** (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) – ligand indukujący apoptozę związany z TNF; **VACV** (*vaccinia virus*) – wirus krowianki.

1. WSTĘP

Białka szoku cieplnego [ang. *heat shock proteins, HSP*] i ich wytwarzanie w komórkach pod wieloma względami stanowią ciekawą zagadkę biologiczną. Zastanawiającym faktem jest uniwersalność tych białek, wręcz niespotykana w przyrodzie. Należą one do białek o sekwencji aminokwasowej zachowanej w ewolucji i spotykamy je we wszystkich komórkach od bakterii do człowieka [48,78].

Zmiana ekspresji tych białek pod wpływem temperatury o kilka stopni wyższej niż temperatura fizjologiczna został po raz pierwszy zaobserwowany przez F. M. Ritossa w 1962 roku w komórkach muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [39,41]. Początkowo sądzono, że główną rolą HSP jest zapobieganie denaturacji białek zachodzącej w warunkach podwyższonej temperatury. Wkrótce wykazano jednak, że ekspresję genów kodujących HSP indukuje ekspozycja komórek na liczne egzogenne i endogenne czynniki, nazywane stresorami (ang. *molecular stressor*), którymi mogą być: analogi aminokwasów, metale ciężkie, alkohole, wolne rodniki, wiele trucizn metabolicznych, zmiana pH środowiska, zakażenia wirusowe i bakteryjne, niedobór glukozy, cytokiny, promieniowanie UV i inne czynniki [39,41,58,80].

Niektóre geny kodujące HSP są również odczytywane w procesie transkrypcji, w warunkach fizjologicznych ze znacznie jednak mniejszą wydajnością niż w warunkach stresu komórkowego. HSP są stale produkowane na poziomie 5–10% wszystkich białek wytwarzanych przez komórkę. Powstają w przebiegu cyklu komórkowego, podczas różnicowania, embriogenezy lub przy stymulacji przez komórkowe czynniki wzrostu. Sygnałem informującym komórkę o konieczności pobudzenia ekspresji genów *hsp* mogą być także zmiany właściwości błony cytoplazmatycznej. HSP stanowią przypuszczalnie ogniwo alternatywnych szlaków metabolicznych, uruchamianych podczas prawidłowych procesów fizjologicznych oraz w stanach patologicznych [5,15,32,64,88,111].

Szybka i intensywna indukcja HSP w odpowiedzi na różne potencjalnie szkodliwe czynniki wskazuje, że białka te łączą komórkę ze światem zewnętrznym. Mogą one chronić ją przed niepożądaną stymulacją, prawdopodobnie przez długookresową ekspresję białka czy współdziałając z określoną grupą genów, tzw. genów natychmiastowych (*immediate early genes*) mających zdolności do szybkiej oraz przemijającej ekspresji w komórkach (np. neuronach) w odpowiedzi na różne bodźce zewnątrzkomórkowe [17].

HSP chronią komórki przed szkodliwym wpływem czynników metabolicznych i środowiskowych. Regulują one komórkową proliferację i różnicowanie, a także czuwają nad utrzymaniem prawidłowych czynności organelli komórkowych. Podstawą prawidłowego funkcjonowania białek jest ich odpowiednia konformacja. HSP (m.in. HSP20, 70 i 90) działają przez tworzenie przejściowych kompleksów z innymi białkami, umożliwiając polipeptydom przyjęcie bądź odzyskanie natywnej struktury. Indukują powstawanie określonych zmian konformacyjnych, niezbędnych dla sprawnego przemieszczania białek przez błony biologiczne. Asocjacja powstających podczas translacji łańcuchów polipeptydowych z białkami opiekuńczymi zapobiega niekiedy przypadkowej ich agregacji i wpływa na prawidłowe ich kształtowanie po opuszczeniu rybosomów. HSP biorą też udział w eliminacji uszkodzeń, takich jak nieprawidłowe zwinięcie czy denaturacja białka. Powodują dysocjację agregatów wytworzonych podczas tej ostatniej i umożliwiają ich powrót do stanu natywnego [41,48]. Zapobiegają też nieprawidłowym oddziaływaniom pomiędzy białkami a DNA [16,32,33].

HSP biorą również udział w regulacji apoptozy – programowanej śmierci komórek (*PCD, programmed cell death*). Wywierają, między innymi, modulujący wpływ na jej przebieg w komórkach nowotworowych – w błonie cytoplazmatycznej komórek nowotworowych dochodzi do zwiększonej ekspresji HSP, które interferują z apoptozą tych komórek indukowaną przez TNF- α oraz FasL.

HSP mogą też uczestniczyć w patologicznych reakcjach immunologicznych biorąc udział w prezentacji antygenów i w procesie tworzenia przeciwciał. Mogą również odgrywać rolę w patogenezie niektórych procesów autoimmunologicznych [45,86,100] oraz wielu innych chorób, w tym w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RA), cukrzycy insulinozależnej (IDDM), odczynowym zapaleniu stawów (ReA), toczniu układowym (SLE) i chorobie Alzheimera [47,64,92].

Liczne badania nad białkami stresu wykazały, że niektóre HSP wzmagają rozwój nowotworów *in vivo* oraz umożliwiają ‘ucieczkę’ komórek nowotworowych przed mechanizmami efektorowymi układu odpornościowego [25,29]. Badanie poziomu HSP

może mieć istotne znaczenie przy prognozowaniu zaawansowania chorób nowotworowych. Wykazano, że HSP27, HSP70 i HSP90 są syntetyzowane w przypadku większości ludzkich nowotworów. Z danych literaturowych wynika [6,19,83], że HSP70 lokalizują się na powierzchni niektórych komórek nowotworowych stając się antygenami rozpoznawanymi przez komórki NK. Nadekspresja HSP70 występuje często w nowotworach sutka, macicy, płuc, jajnika, trzustki lub w komórkach białaczkowych. Wykazano również, że nowotwory z wysoką ekspresją HSP27 zawierają mniejszą liczbę komórek apoptotycznych. Nadekspresję sHSP wykryto między innymi w nowotworach nerki u szczurów i nowotworach mózgu u ludzi [6,15,35,46]. W wielu przypadkach wskazuje to na możliwość wystąpienia oporności komórek na chemioterapię, promieniowanie lub hipertermię [42,63,95].

2. REGULACJA SYNTEZY HSP

Aktywacja genów HSP w odpowiedzi na działanie stresorów molekularnych jest reakcją przejściową i odwracalną, regulowaną na poziomie transkrypcji i translacji [51,80]. Indukcja genów HSP odbywa się za pośrednictwem wiązania się multimerów białkowego czynnika transkrypcyjnego, określanego jako czynnik szoku cieplnego (ang. *Heat Shock Factor*; HSF) z wysoce konserwatywną sekwencją DNA, zwaną elementem szoku cieplnego (ang. *Heat Shock Element*; HSE), występującą w promotorach genów HSP. W normalnych warunkach HSF, w formie monomerycznej, jest przyłączany do innych cytoplazmatycznych białek, które zapobiegają jego wiązaniu się z DNA. Po zadziałaniu czynnika stresogennego, białko HSF ulega fosforylacji, tworzy trimery i jest transportowane do jądra komórkowego, gdzie łączy się z HSE, co rozpoczyna indukowaną przez stres transkrypcję genów HSP [6,12,88]. Wzmożona transkrypcja genów *hsp*, powoduje syntezę HSP70, co z kolei prowadzi do dysocjacji trimerów HSF i zahamowania transkrypcji genów *hsp* [65].

Dotychczas wyizolowano cztery czynniki transkrypcyjne: HSF1–3 oraz HSF4, który specyficznie występuje w komórkach ludzkich. HSF4 wiąże się konstytutywnie do DNA, jednak w przeciwieństwie do pozostałych nie wykazuje aktywności transkrypcyjnej, co sugeruje, że pełni on rolę w procesie negatywnej regulacji indukcji ekspresji HSP. HSF1 i HSF3 są aktywowane po zadziałaniu podwyższonej temperatury przez jony metali ciężkich, analogi aminokwasów i stres oksydacyjny, natomiast indukcja HSF2 zachodzi w czasie różnych stadiów różnicowania komórek oraz obserwowana jest podczas spermatogenezy u myszy. Dodatkowo, poziom HSF2 jest zróżnicowany narządowo, najwięcej białka wykryto w jądrach, mięśniach szkieletowych i mózgu, natomiast najmniej w wątrobie, śledzionie i nerce [57,58]. HSF2 zaangażowany jest również w ekspresję genów HSP, takich jak HSP89 alfa i HSC70, które na stałym poziomie powstają, między innymi, w czasie embriogenezy u ssaków [42,51,88].

Większość genów dla HSP nie ma intronów (tj. niekodujących sekwencji DNA), co przypuszczalnie jest spowodowane koniecznością ich szybkiej ekspresji w postaci

dojrzałych, funkcjonalnych transkryptów [5]. W warunkach stresu zmniejsza się wytwarzanie dużej liczby białek komórkowych z wyjątkiem HSP, których synteza ulega znacznemu zwiększeniu, do tego stopnia, że w sytuacjach ekstremalnych komórki produkują jedynie HSP. Związane jest to ze zmianami w procesie translacji, polegającymi na szybkiej degradacji normalnego, komórkowego mRNA, podczas gdy mRNA dla HSP odznacza się większą stabilnością i jest preferencyjnie tłumaczony [80].

W komórkach eukariotycznych zidentyfikowano również geny *hsc* (*heat shock cognate*), mające niemal identyczną sekwencję jak geny *hsp*, które ulegają ekspresji w warunkach bezstresowych. Nie zaobserwowano jednak indukcji syntezy mRNA dla *hsc* po podwyższeniu temperatury. Produkty genów *hsc* są prawdopodobnie wersjami białek HSP, niezbędnymi w normalnych, bezstresowych warunkach rozwoju komórki [5,65,88].

Lokalizacja HSP w komórkach jest zdeterminowana ich powinowactwem do określonego organellum komórkowego lub obszaru cytoplazmy, w którym znajduje się substrat. W warunkach fizjologicznych HSP wykrywane są głównie w cytoplazmie między innymi w regionach, w których odbywa się proces biosyntezy polipeptydów, w mitochondriach, w siateczce śródplazmatycznej [ER] (m.in. HSP70), związane z cytoszkieletem, zasocjowane z mikrotubulami w czasie cyklu komórkowego (m.in. HSP90) lub umieszczone w błonie cytoplazmatycznej komórek nowotworowych, gdzie są antygenami rozpoznawanymi przez komórki NK [83]. Pod wpływem zadziałania stresorów obserwuje się wzrost poziomu tych białek na terenie cytoplazmy oraz wzmożoną translokację HSP z cytoplazmy do jądra i jąderka. HSP chronią struktury jądra i jąderka oraz przywracają im utracone funkcje, ponieważ w jądrze podczas stresu następuje akumulacja i agregacja ziarnistości perichromatyny, składającej się głównie z niedojrzałego mRNA, w jąderku natomiast agregacji ulegają prerybosomy i inne kompleksy nukleoproteinowe [8,41].

3. KLASYFIKACJA HSP I CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH RODZIN

HSP należą do kilku rodzin, do których zostały zaklasyfikowane w zależności od ich masy cząsteczkowej wyrażonej w kilodaltonach (kDa), którą z kolei wyznaczono na podstawie ruchliwości tych polipeptydów w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Ten arbitralny podział HSP w znacznym stopniu odzwierciedla także różnice ich właściwości biologicznych. HSP zostały zgrupowane w następujące rodziny: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 oraz HSP o niskiej masie cząsteczkowej (ang. *small HSP*, *sHSP*; 30–16 kDa) [83]. Poznano również klasy białek, których właściwości różnią się od powyższych grup, m.in: grupa białek zlokalizowana w komórkach eukariotycznych, dla której czynnikiem inicjującym ekspresję jest zmiana poziomu glukozy – stąd wywodzi się ich nazwa GRPs (ang. *glucose-regulated proteins*). Białka

te charakteryzują się masą cząsteczkową 75, 78 i 94 kDa, co według aktualnie przyjętych kryteriów zalicza je do szeroko pojętej rodziny HSP [39].

Rodzina HSP90

U kręgowców znajduje się kilka genów z rodziny HSP90. Białka te są syntetyzowane zarówno w warunkach normalnych (HSP90 stanowi 1–2% całkowitej ilości białek cytoplazmatycznych), jak i pod wpływem zadziałania czynników stresogennych. Na podstawie analizy DNA stwierdzono, że homologia sekwencji aminokwasowych w HSP90 organizmów eukariotycznych wynosi ok. 50% oraz że sekwencje te są homologiczne z takimi białkami *Escherichia coli* co najmniej w 40%. W komórkach ssaków HSP90 występuje w dwóch izoformach – HSP90 α oraz HSP90 β , które tworzą oligomeryczne kompleksy. Są one zasocjowane z licznymi białkami komórkowymi, w tym z receptorami hormonów steroidowych oraz kinaz fosforylujących podjednostkę α eukariotycznego czynnika inicjującego transkrypcję. Rola HSP90 polega więc, między innymi, na kontroli aktywności innych makromolekuł komórkowych, z których najważniejsze wydają się być kinazy białkowe i czynniki transkrypcyjne [23,41,53,109].

Interakcja HSP90 z wolnymi od hormonów receptorami steroidowymi odgrywa główną rolę w regulacji i aktywacji receptorów. HSP90 asocjuje co najmniej z 7 białkami w heterokompleksach receptorów wolnych od hormonów. Po związaniu ligandu i dysocjacji heterokompleksu do pojedynczych protein hormon wiąże receptor. Centralną rolę w regulacji receptora odgrywa interakcja HSP90 z domeną sygnałową (ang. *hormone binding domain*) receptora. Rolą HSP90 nie jest proste mediowanie inaktywacji receptorów steroidowych przy braku ligandu, ale utrzymanie receptorów w stanie „gotowości” do aktywacji [40,47].

Rodzina HSP70

HSP70 wyróżniają się spośród innych białek największą stabilnością ewolucyjną i największym międzygatunkowym podobieństwem. Wykazują homologię sekwencji w 50%, a ich wspólną cechą jest wysokie powinowactwo do ATP [81,104]. Do rodziny HSP70 zalicza się ponad 10 białek o masie cząsteczkowej od 68 do 78 kDa, są to m.in. HSC70 – białko o sekwencji bardzo podobnej do HSP70, wytwarzane w komórkach niepoddanych stresowi, występujące na stałym poziomie w jądrze i cytoplazmie niezależnie od fazy cyklu komórkowego, GRP78 (*Glucose Regulated Protein*) – białko wiążące łańcuchy ciężkie immunoglobulin w ER komórek pre-B, limfocytów B i komórek plazmatycznych, które zapobiega przedwczesnemu łączeniu się łańcuchów ciężkich Ig [13] oraz HSP72, zwany „diagnostycznym markerem stresu”, gdyż jego obecność w komórce jest ściśle związana z szokiem cieplnym [41,59].

Aktywność HSP70 regulowana jest przez HSP40, które aktywuje hydrolizę ATP związanego z HSP70 oraz umożliwia tworzenie stabilnego kompleksu HSP70-substrat [58]. Cząsteczki z rodziny HSP70 wiążą się z niektórymi, nowo syntetyzowanymi białkami i zapobiegają tworzeniu się nieprawidłowych konformacji. Ponadto, są one zaangażowane w rozwijanie białek cytoplazmatycznych i biorą udział w transporcie

tych białek do nowych kompartmentów, między innymi mitochondriów i ER. Wewnątrz tych przedziałów HSP70 promują zwijanie tych białek i, jeśli jest to konieczne, gromadzą je w postaci oligomerycznych kompleksów [16,33,47]. Według hipotezy Pelhama [80,86,58], w czasie szoku termicznego białka ulegają częściowej denaturacji, eksponując rejony hydrofobowe, które oddziałują ze sobą, co prowadzi do powstania nierozpuszczalnych białkowych agregatów. HSP70, wiążąc się z hydrofobowymi rejonami, mogą ograniczać niekorzystne interakcje. Następnie wykorzystując energię hydrolizy ATP mogą zmieniać swoją konformację i dysocjować z kompleksu. Zmiana konformacji HSP70 może z kolei indukować zmianę struktury białka związanego z HSP70 i powodować jego dysocjację. Uwolnione białko ma więc szansę powrotu do konformacji sprzed zadziałania czynnika uszkodzającego [58,86].

Ekspresja HSP70 (obok innych HSP i HSC) odgrywa istotną rolę w nabywaniu termotolerancji, czyli oporności komórki na działanie wysokiej, letalnej temperatury. Zaobserwowano, że szok termiczny wzmacnia syntezę HSP, co ma związek z chwilowym rozwojem termotolerancji; trwałość tego stanu jest związana ze stabilnością HSP. Komórki trwale odporne na szok termiczny wykazują stałą, wysoką ekspresję HSP [24,79]. Ostatnie badania wykazały, że termotolerancja komórkowa związana jest z lokalizacją HSP72 i HSP73 w jądrze komórkowym. HSPs są ponadto zaangażowane w ochronę procesu składania RNA (*ang. splicing*) przed działaniem wysokiej temperatury [64,81].

Geny dla HSP70 są zlokalizowane w obszarze układu zgodności tkankowej MHC, pomiędzy regionami genów I i II klasy, co pozwala przypuszczać, że cząsteczki te mogą być włączone w proces prezentacji antygenów [47,89]. HSP70 mają bardzo silne właściwości immunogenne i wykazano, że mogą być dominującym antygenem licznych czynników zakaźnych, w tym *M. tuberculosis*, a także innych czynników zakaźnych i inwazyjnych. Biorąc pod uwagę znaczne międzygatunkowe podobieństwo strukturalne białek z tej rodziny, istnieje prawdopodobieństwo typowej reakcji krzyżowej i wystąpienia reakcji immunologicznej skierowanej przeciwko własnym białkom na powierzchni komórek gospodarza [86,110].

Wykazano również, iż HSP70 może służyć jako marker uszkodzeń neuronów, a wobec tego, że w niektórych sytuacjach indukcja HSP70 jest proporcjonalna do stopnia uszkodzenia, może on być użyty jako «indeks ostrości uszkodzenia» w komórkach [81,83].

Niskocząsteczkowe sHSP

Jest to grupa białek o masie cząsteczkowej 16–30 kDa, które są intensywnie syntetyzowane w warunkach szoku termicznego. Odznaczają się dużą trwałością i można je wykryć jeszcze po ustąpieniu stresu, a czas ich połowicznego rozpadu dochodzi do 52 godzin.

Do tej rodziny zalicza się sześć białek: HSP27 (HSP28 u ludzi i HSP25 u myszy), HSP20, HSPB2, HSPB3, α A-kryształinę i β B-kryształinę. sHSP występują w homo- i heterokompleksach o masie cząsteczkowej od 500 do 800 kDa [6]. HSP25 i α A-kryształina są najprawdopodobniej produktami proteolitycznego rozpadu HSP27, są bowiem rozpoznawane przez przeciwciała anti-HSP27, co świadczy o ich podobieństwie antygenowym [15].

Białka należące do tej rodziny mogą występować w trzech izoformach o różnym stopniu ufosforylowania. Za fosforylacyjną modyfikację sHSP (m.in. HSP27 – seryna 15, 78 i 82; HSP25 – seryna 15, 86) odpowiedzialne są specyficzne dla tej grupy białek kinazy (m.in. MAPKAP kinaza 2 i 3) oraz fosfatazy. Fosforylacja jest niezbędna do przejścia od dużych oligomerów do postaci niskocząsteczkowych i jest indukowana przez różne czynniki, m.in. wysoką temperaturę, TNF- α , stres oksydacyjny, IL-1, IL-3 i IL-6, histaminę lub mitogeny. Badania wykazały, że komórki zawierające sHSP, które nie mogą ulegać fosforylacji, są bardziej wrażliwe na działanie czynników uszkodzających [6,15].

Interesującą właściwością tych białek jest ich ekspresja podczas różnicowania się komórek w określonych stadiach wzrostu, np. HSP25 występuje konstytutywnie w szkieletcie, mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym i mózgu, podczas gdy najczęściej α A-kryształiny i β B-kryształiny jest w soczewce oka. U młodych myszy HSP25 nie jest wykrywalny, podczas gdy β B- i α A-kryształina są stale obecne [6,15,35,85]. Białka te zaangażowane są, między innymi, w nabywanie przez płód tolerancji na ciepło. Termotolerancja wywołana nieletalnym szokiem termicznym obniża śmiertelność komórkową, zwiększa przeżywalność embrionów i wpływa na ich lepszy wzrost i rozwój [6,17,41].

HSP27 chroni komórki przed śmiercią spowodowaną uwalnianiem wolnych rodników (ROS; ang. *reactive oxygen species*) – pośrednio przez wzrost komórkowego poziomu glutationu i bezpośrednio przez neutralizację efektów toksycznych utlenionych białek. HSP27 jest również zaangażowany w procesie śmierci komórkowej mediowanej przez CTL [11,39].

HSP27 odgrywają również rolę w polimeryzacji aktyny. W warunkach fizjologicznych, nieufosforylowane HSP27 przyłącza się do haczykowatego końca prawidłowo zszyntetyzowanego filamentu aktynowego, ograniczając jego dalszą polimeryzację. Szok termiczny oraz fosforylacja HSP27 powoduje odłączanie tych białek od końców, umożliwiając w ten sposób wiązanie kolejnych monomerów aktyny z odblokowanymi filamentami. Przyspiesza to powrót uszkodzonych mikrofilamentów do prawidłowego stanu fizjologicznego.

3. ROLA HSP W KOMÓRCIE

HSP w odpowiedzi immunologicznej

Działanie HSP jest ściśle związane z wewnątrzkomórkowym metabolizmem białek, czego następstwem jest udział tych białek w zjawiskach immunologicznych. Uważa się, że HSP są włączone w zjawiska odporności, a układ immunologiczny zaadaptował te cząsteczki do swoich szczególnych funkcji. Intensywne badania prowadzone w tym zakresie pozwalają wskazać kilka możliwości zaangażowania HSP w wielu reakcjach immunologicznych [46,101].

HSP mogą pełnić rolę klasycznego antygeny egzogenne i wywoływać immunologiczną odpowiedź komórkową i humoralną. Układ odpornościowy może reagować na własne HSP, co prowadzi do odpowiedzi autoimmunologicznej. Związane to jest z niedoskonałością negatywnej selekcji HSP-reaktywnych limfocytów T w procesie ich dojrzewania w grasicy. Udział HSP w odpowiedzi immunologicznej może być związany

ze zjawiskiem molekularnego podobieństwa między egzogennym HSP a HSP gospodarza [48,62,95,100].

Podstawową właściwością wielu HSP jest ich zdolność do wiązania się z innymi białkami i modyfikowania w ten sposób ich funkcji i przeznaczenia. Ma to również związek z odpowiedzią immunologiczną, która najczęściej skierowana jest przeciwko peptydowi, który tworzy kompleks z HSP. Interakcja HSP z innymi białkami lub peptydami wielokrotnie zwiększa właściwości immunogenne kompleksu HSP - substrat [13,95]. Wykazano, że utworzone *in vitro* kompleksy HSP70 - peptyd mają specyficzną aktywność immunologiczną i wywołują odpowiedź CTL CD8⁺. Ostatnie badania wykazały, że HSP70 w kompleksie z innym białkiem może wywołać również odpowiedź CTL CD8⁺ podczas nieobecności limfocytów T CD4⁺. Wysłunęto hipotezę, że ochronna, antywirusowa odpowiedź CTL CD8⁺ może być indukowana przez immunizację zdefiniowanym białkiem wirusowym skoniugowanym z HSP [37,98,102,110].

Dane literaturowe [44,101] wskazują, że peptyd połączony z HSP70 lub HSP94 jest szybciej i lepiej przetworzony przez komórkę fagocytyującą i prezentowany w połączeniu z białkami MHC klasy I komórkom T CD8⁺, jak i w kontekście białek MHC klasy II komórkom CD4⁺. Wykazano, że makrofagi i komórki B mają na powierzchni białka należące do rodziny HSP70, natomiast mAb swoiste dla HSP72/73 powodują obniżenie zdolności makrofagów do prezentacji antygeny [96].

HSP70 połączone z cząsteczkami MHC klasy II są włączone w proces rozpoznawania antygeny przez komórki T $\alpha\beta$. Wykazano też, że HSP mogą być antygenami komórek T typu $\gamma\delta$ oraz mogą być włączone we wzajemne oddziaływanie komórek T $\gamma\delta$ ⁺ i komórek [47,89]. Nie można też wykluczyć, że HSP same mogą wynosić krótkie peptydy na powierzchnię komórki, bez udziału ewolucyjnie młodszych białek MHC.

Stwierdzono, że HSP współdziałają z makrofagami, komórkami dendrytycznymi, limfocytami T, indukując uwalnianie cytokin i chemokin oraz odgrywają istotną rolę w dojrzewaniu i migracji komórek dendrytycznych. Przykładem jest białko HSP65, które powoduje uwalnianie cytokin z monocytów, gp96 indukuje dojrzewanie komórek dendrytycznych, co z kolei prowadzi do uwalniania prozapalnych cytokin, między innymi IL-1 β , IL-12, MCP-1 [90,94,102,103]. Również białko GRP78 należące do rodziny HSP70 bierze udział w łączeniu łańcuchów cząsteczki Ig i reguluje ich wewnątrzkomórkowe przemieszczanie [106]. Ponadto, bakteryjne HSP indukują ekspresję prozapalnych cytokin, m.in. TNF α , IL-1 α , IL-6, GM-CSF w monocytach i makrofagach (ryc.1) [102,103].

HSP działają więc jako adjuwanty, które sprzyjają odpowiedzi cytotoksycznej limfocytów w stosunku do białek i peptydów pozostających z nimi w kompleksach. Dodatkowo, przyczyną wydajnej immunogenności kompleksu HSP - peptyd jest zdolność wnikania peptydu do komórki prezentującej antygen, obecność specyficznych receptorów dla HSP na powierzchni APC, a także możliwość połączenia białek HSP z białkami transportowymi (TAP; ang. *transporters associated with antigen processing*) [13,21,69,100,110].

W przebiegu wielu chorób zakaźnych u ludzi m.in. gruźlicy, trądu lub choroby Legionistów, rozwijająca się odpowiedź immunologiczna skierowana jest również

generowany *in vitro* i aktywność biologiczna tych kompleksów jest porównywalna do kompleksów HSP - białko tworzonych *in vivo* [12,38].

Jak już wspomniano wcześniej, HSP izolowane z komórek zakażonych wirusem wywołują swoistą odpowiedź immunologiczną, w odróżnieniu od komórek zdrowych, gdzie takiej odpowiedzi się nie obserwuje. Odpowiedź immunologiczna skierowana jest przeciwko peptydowi, który tworzy kompleks z białkiem HSP. Przykładem są mysie otrzewnowe makrofagi, wśród których występują przypuszczalnie makrofagowe prekursorzy komórek dendrytycznych, które mogą ze środowiska endocytować kompleksy peptydów i HSP, np. GP96-peptydy i kierować te peptydy do wiązania z białkami MHC klasy I oraz prezentowania tego kompleksu na powierzchni komórki. Wykazano, między innymi, że antygeny wirusowe, np. peptyd VSV (*Vesicular Stomatitis Virus protein*) w kompleksie z HSP (GP96) stymuluje 200–400 razy wydajniej CTL niż sam peptyd VSV [12,49,16,98].

Ostatnie badania [55] wykazały, że białka HSP wprowadzone z białkami wirusowymi indukują odpowiedź limfocytów T CD8⁺ i wywołują protekcyjną immunogenność przeciwko HHV-1 (*Human Herpes Virus type 1*; wirus opryszczki typu 1). Chaperony działają tu jako potencjalny adjuwant, gdy są przyłączone kowalencyjnie lub niekowalencyjnie do innych białek.

Aktywność kompleksu HSP70 - peptyd do wywoływania odpowiedzi CTL podczas nieobecności komórek CD4⁺ sugeruje, że HSP70 może być pożytecznym środkiem w profilaktyce i terapii antywirusowej, np. przeciw HIV-1 [kompleks HSP70-p24]. Tropizm HIV wiąże się z komplementarnością gp120 osłonki zewnętrznej HIV z antygenem różnicowania CD4⁺ obecnym na powierzchni subpopulacji Th limfocytów T [3,20].

W badaniach nad HTLV-1 (*Human T-cell Lymphotropic Virus type 1*; T-komórkowym wirusem limfotropowym typu I) wykazano, że HSP mogą łączyć się z białkami wirusowymi i promować jego gromadzenie się, stabilizację białek wirusowych oraz ułatwiać transport białek wirusa przez przedziały komórkowe [4]. Infekcja ludzkich makrofagów wirusem krowianki (VACV) powoduje w nich wzrost produkcji HSP70, które w dużym stopniu są zasocjowane z białkami wirusowymi, co sugeruje udział HSP w gromadzeniu się wirusa. Dodatkowo HSP70 ma podobną budowę jak białko prekursorowe kapsydów wirusa polio, coxsackie oraz adenowirusów. Nie jest więc wykluczone, że indukcja HSP jest niezbędna podczas replikacji niektórych wirusów. Przykładem jest białko Gam1 kodowane przez wirus CELO małp, które podczas replikacji wirusa odpowiada za indukcję ekspresji HSP, głównie HSP40, wykazującego istotną rolę w procesie replikacji. Indukcja HSP jest obserwowana, między innymi, podczas replikacji cytomegalowirusów, herpeswirusów i adenowirusów [30,68,75].

Dane literaturowe [32,37] wskazują, iż indukcja ekspresji HSP może odgrywać kluczową rolę w możliwości zewnątrzkomórkowych patogenów, takich jak *Mycobacterium tuberculosis* lub *Salmonella typhimurium*, do przeżycia wewnątrz komórki. Ponadto, jak wykazano mutant *S. typhimurium*, u którego nie obserwuje się wzrostu poziomu HSP po fagocytozie, jest mniej zdolny do przeżycia wewnątrz makrofagów i mniej wirulentny *in vivo*, w porównaniu z dzikim szczepem tych bakterii.

W komórce bakterii *Escherichia coli*, mRNA kodujący HSP jest syntetyzowany *de novo* po wzroście temperatury z 30°C do 43°C. Indukcja transkrypcji genów *hsp* *E. coli* rozpoczyna się w czasie krótszym od 15 sekund po zmianie temperatury. Maksymalny poziom syntezy mRNA HSP osiągany jest w czasie od 4 do 8 minut. Od chwili podwyższania temperatury synteza białek HSP wzrasta od 5 do 20 razy w porównaniu z warunkami bezstresowymi. W czasie przedłużającego się szoku synteza mRNA *hsp* (jak i białka) zostaje częściowo zahamowana. Po 20–30 minutach podwyższenia temperatury ustala się nowy poziom syntezy mRNA *hsp*, nieznacznie tylko wyższy niż w warunkach bezstresowych. Mutacje w genach *hsp* (ok. 19 białek) *E. coli* powodują zaburzenia podstawowych czynności komórkowych: syntezy DNA i RNA i białek oraz modyfikacji i degradacji białek. Większość wyizolowanych mutacji w genach *hsp* *E. coli* powoduje także zahamowanie replikacji DNA i morfogenezy fagów lambda i T4 [57,92,105,34].

Zakażenie *E. coli* bakteriofagiem lambda wywołuje indukcję HSP nawet w 37°C. Synteza HSP wywołana infekcją wirusową jest zależna od białka σ -32 produktu genu *htpR*. Wyizolowano mutanty bakteryjne, które uniemożliwiają rozwój bakteriofaga λ (mutacje typu *gro*). Pewna część tych mutacji została znaleziona w genach kodujących białka HSP: mutacje w genach *dnaK*, *dnaJ* i *groPE* blokują replikację DNA faga lambda, natomiast mutacje *groEL* i *groES* hamują jego morfogenezę [24,27,28,57,62].

Przedstawiciele *Salmonella* sp. w warunkach doświadczalnych (infekcja makrofagów w hodowli) wytwarzają około 30 nowych białek, w tym dwa HSP typowe dla *Enterobacteriaceae* – *groEL* i *DnaK*. Mutanty *Salmonella* pozbawione inwazyjności i z łatwością niszczone przez makrofagi nie potrafią produkować wielu białek syntetyzowanych w czasie infekcji przez wirulentne szczepy *Salmonella*. Wykazano, że *S. typhimurium* poddana działaniu H_2O_2 wytwarza HSP, co pozwala jej na przetrwanie w szczególnie trudnych warunkach środowiskowych, np. we wnętrzu komórek fagocytyzujących [32,62,63].

HSP są dominującymi antygenami w wielu zakażeniach wywoływanych przez dronoustroje, dlatego sugeruje się wykorzystanie HSP do produkcji skutecznych szczepionek przeciwko tym drobnoustrojom [86]. Wykazano, że immunizacja myszy rekombinantem HSP60 uzyskanym z *Histoplasma capsulatum* indukuje ochronę przeciwko histoplazmozie płucnej. Immunizacja wywołuje indukcję komórek T CD4⁺ oraz wzrost poziomu cytokin, takich jak: IFN- γ , IL-10 i IL-12 w komórkach śledziony immunizowanych myszy. Wykazano również, że immunizacja myszy GroES (HSP10) i GroEL (HSP60) otrzymanymi od *Helicobacter pylori* stanowi ochronę przed rozwinieniem się choroby. Ponieważ GroES wykazuje dużą homologię sekwencji aminokwasowej wśród *M. avium*, *M. paratuberculosis* i *M. leprae*, infekcja jednym prątkiem wywołuje częściową ochronę przeciwko infekcji innymi myko-bakteriami. Badano również skuteczność antygeny HSP60 *Yersinia* sp. w czasie zakażenia myszy *Y. enterocolitica*. Zademonstrowano specyficzne *Yersinia* HSP60 komórki T i indukcję odpowiedzi immunologicznej [62,74].

Szczególne miejsce wśród HSP zajmuje rodzina HSP65. Analiza sekwencji DNA wykazała identyczność genów *hsp65* u *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* i *M.*

paratuberculosis oraz duże podobieństwo genów (90% homologii) z *M. leprae*. Stwierdzono, że HSP65 *Mycobacterium* sp. należą do konserwatywnych, wspólnych białek licznych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz archebakterii. Ponadto, przeciwciała przeciwko HSP65 *Mycobacterium* sp. rozpoznają białka o podobnej masie w komórkach drożdży, roślin i człowieka [37,48].

HSP mogą również w przyszłości odegrać ważną rolę w walce z chorobami wywołanymi przez priony. Zaobserwowano bowiem [93,70], że HSP104 uczestniczą w indukcji konformacyjnych zmian białek PrP^c w drożdżach w ich formę zakaźną PrP^{sc}. Obie te formy mają taką samą sekwencję aminokwasową, co wskazuje, że przejście do izoformy związanej z chorobą jest związane z posttranslacyjną modyfikacją i charakteryzuje się zmianami strukturalnymi białka – PrP^c ma 42% „alfa-helisy” i prawie wcale nie ma struktury „beta-sheet”, podczas gdy PrP^{sc} ma 43% „beta-sheets” i 30% „alfa-helisy”. Zaburzenia konformacji są odpowiedzialne za różnice w metabolizowaniu białek i ich lokalizacji w komórce. Zakaźna postać choroby wywoływanej przez priony jest prawdopodobnie wynikiem wprowadzenia preformowanego PrP^{sc}, które na skutek kontaktu z prawidłowym PrP^c komórki zapoczątkowuje autokatalityczną reakcję łańcuchową prowadzącą do przemiany dużej ilości PrP^c w formę pośrednią PrPⁱ i PrP^{sc}. Szybkość procesu przemiany zależy od stopnia homologii pomiędzy patogennym PrP^{sc} i endogennym PrP^c. Uważa się, że HSP mogą być zaangażowane w tworzenie struktury PrP^{sc} i brać udział w rozwoju choroby, lecz możliwe też, że same PrP^{sc} mogą działać dla samych siebie jako „chaperony” [61,91,93].

Udział HSP w apoptozie

Organizmy wielokomórkowe, narażone na stałe oddziaływanie środowiskowych, uszkadzających czynników zakaźnych, chemicznych i fizycznych, wykształciły podczas ewolucji złożony system mechanizmów obronnych, wśród których istotną rolę odgrywa fizjologiczna śmierć komórki.

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki (*programmed cell death, PCD*), w przeciwieństwie do martwicy (*necrosis; nekrozy*) jest procesem fizjologicznym, dzięki któremu odbywa się eliminacja niepotrzebnych komórek lub komórek uszkodzonych w takim stopniu, że naprawa uszkodzenia nie jest możliwa. PCD odgrywa istotną rolę w rozwoju embrionalnym oraz utrzymaniu homeostazy organizmów wielokomórkowych, jest niezbędna w regulacji procesów immunologicznych, takich jak: selekcja negatywna autoreaktywnych limfocytów T w grasicy oraz usuwanie dojrzałych autoreaktywnych limfocytów T na obwodzie [2,3]. Zakłócenia procesu śmierci komórkowej prowadzą do rozwoju nowotworów, chorób autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych oraz uszkodzeń tkanek wywołanych niedokrwieniem (np. podczas zawału mózgu lub mięśnia sercowego) [97].

Apoptoza rozpoznawana jest jako zjawisko charakterystycznych zmian biochemicznych i morfologicznych komórek prowadzących do ich śmierci poprzez proteolityczną i nukleolityczną degradację składników komórki [22,31]. Szlak apoptozy może zostać zapoczątkowany w różnych komórkach za pośrednictwem różnych bodźców.

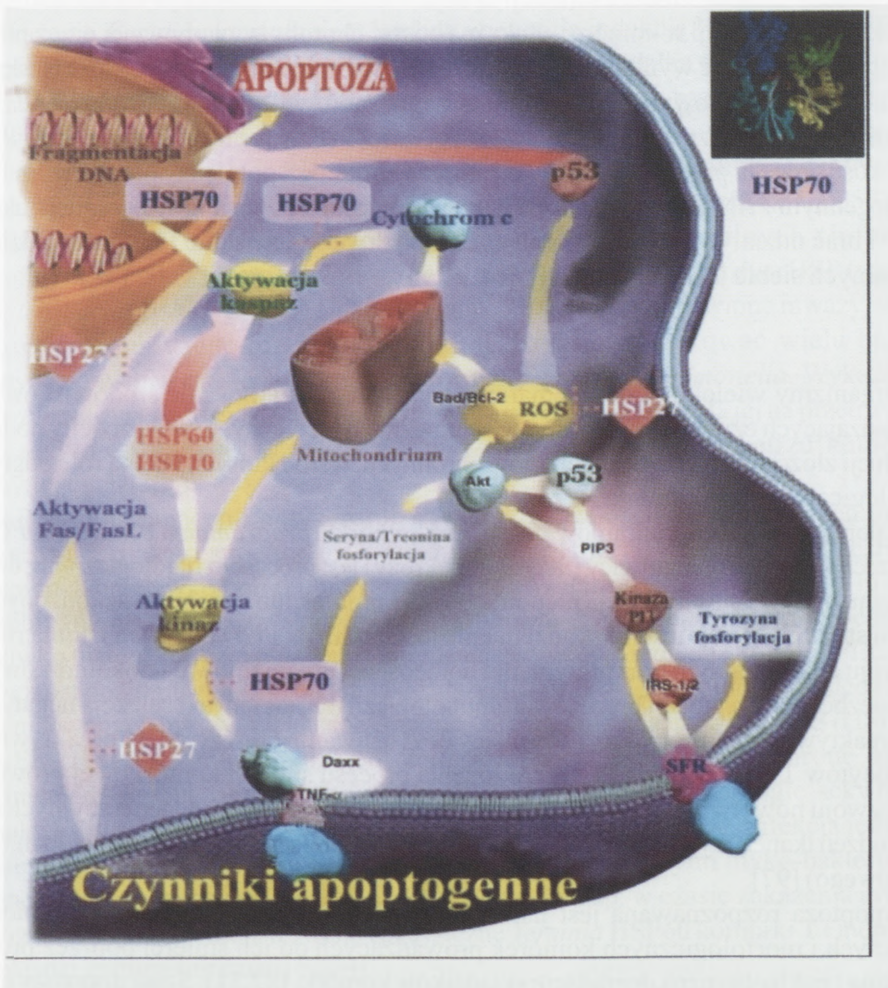
Podatność na uruchomienie PCD i szybkość jego uruchomienia zależy od typu i stopnia zróżnicowania komórki [52].

W procesie fizjologicznej śmierci komórki można wyróżnić następujące etapy:

(i) faza inicjatorowa (wzbudzenia), podczas której komórki otrzymują sygnały mogące prowadzić do aktywacji szlaków PCD;

(ii) faza wykonawcza, obejmująca transdukcję sygnału do systemu bezpośrednich wykonawców śmierci oraz związana z aktywacją proteaz i ich regulatorów;

(iii) faza ostatnia to okres zniszczenia, podczas którego aktywne proteazy niszczą struktury komórkowe, zarówno bezpośrednio jak i pośrednio, poprzez aktywację innych enzymów. W tej fazie dochodzi do fragmentacji DNA, rozbicia cytoskieletu, formowania ciałek apoptotycznych oraz ich fagocytozy przez otaczające, nieuszkodzone komórki tkanki lub narządu [52,67].



RYCINA 2. Molekularny mechanizm apoptozy i jej regulacja przez HSP (opracowanie własne wg [29, 42 i 9])

Apoptoza jest wykorzystywana przez organizm gospodarza jako mechanizm obronny, skierowany przeciwko czynnikom chorobotwórczym. Podczas apoptozy degradacji ulegają białka i kwasy nukleinowe zarówno komórki, jak i wirusa, który do niej wtargnął. W ten sposób śmierć zakażonej komórki zapobiega rozprzestrzenianiu się infekcji. W interesie obligatoryjnych pasożytów, jakimi są wirusy, leży więc przeciwdziałanie zniszczeniu komórki, która jest miejscem ich replikacji [52]. W zakażeniach wirusowych apoptoza jest zwykle nieuniknioną konsekwencją replikacji wirusa i jeśli, jak w przypadku wirusa grypy (*Orthomyxoviridae*) i alfa-herpeswirusów, jest ograniczona jedynie do pewnych rodzajów komórek, namnażanie wirusa podczas cyklu litycznego może być na tyle wystarczające, że dalsze szerzenie zakażenia zachodzi bez przeszkód. Wirusy mogą uruchamiać również mechanizmy zakłócania szlaku apoptozy – dotyczy to w szczególności wirusów DNA o długich cyklach replikacyjnych – adenowirusów, herpeswirusów limfotropowych oraz pokswirusów, a także mechanizmów umożliwiających wykorzystanie apoptozy w szerzeniu się zakażenia, przystosowując czas życia i śmierci komórki do własnych potrzeb [7,52].

Istnieje wciąż wiele niejasności, co do sposobu przekazywania sygnału śmierci wzbudzanego przez różnorodne czynniki apoptotyczne, jak też molekularnych uwarunkowań komórki do włączenia programu śmierci. U podstaw zainteresowania mechanizmem samobójczej śmierci komórki leży, oprócz celów poznawczych, potencjalna możliwość regulowania i kontroli procesu apoptotycznego.

Ponieważ indukcja apoptozy i ekspresja HSP wywoływane są przez te same czynniki, można więc doszukiwać się korelacji między tymi dwoma procesami. Od pewnego czasu zaczyna się doceniać udział zarówno dużych HSP z rodziny HSP70 i HSP90, jak i małych (sHSP), których przedstawicielem jest białko HSP27, w ochronie komórek przed działaniem różnych czynników apoptogennych [25,29,31,42].

Molekularne zjawiska zachodzące podczas apoptozy opierają się na stałej obecności w komórce białek zdolnych do inicjacji transdukcji sygnału śmierci oraz białek bezpośrednio biorących udział w fazie wykonawczej. Mechanizmy, za pomocą których HSP modulują proces apoptozy, mogą stanowić rodzaj czasowej inhibicji niektórych genów kodujących te białka, mogą też polegać na zatrzymaniu uszkodzenia komórkowego, osłabieniu sygnału śmierci lub przerwaniu aktywacji lub aktywności sensorów i cząsteczek efektorowych [9,10,39].

Wykazano antyapoptotyczne działanie HSP70 po zadziałaniu zarówno szoku termicznego, jak i TNF- α , cytotstatyku deksorubicyny lub w warunkach nadekspresji kaspazy-3 [31]. Badania na komórkach nowotworowych z użyciem kwercetyny również potwierdziły hamujący wpływ HSP70 na apoptozę. Wykazano, że długotrwałe traktowanie komórek nowotworowych kwercetyną powoduje czasowe obniżenie poziomu HSP70, jak również hamuje późniejszą odpowiedź HSP70 na szok termiczny, co w rezultacie umożliwia kwercetynie indukcję apoptozy. Jeżeli natomiast komórki nowotworowe najpierw były poddane szokowi i dochodziło w nich do syntezy HSP70, późniejsze traktowanie kwercetyną nie wywołało śmierci komórki [19,29,41].

Prawdopodobny jest również udział HSP70 w hamowaniu szlaków prowadzących do kinaz SAPKs/JNKs (*SAPK* – *stress activated protein kinase*; *JNK* – *C-jun N-terminal Kinase*) jak również w niedopuszczeniu do aktywacji prokaspaz (np.

prokaspazy 3) oraz w hamowaniu efektów wynikających z działania już aktywnych kaspaz [9,29,42,66].

W fazie wykonawczej PCD dochodzi do spadku mitochondrialnego potencjału transblonowego ($\Delta\Psi_m$), co prowadzi do uwolnienia czynnika indukującego apoptozę (*apoptosis inducing factor*; AIF) oraz cytochromu c (*apoptotic protease activating factor-2*; Apaf-2), który związany z czynnikiem lub czynnikami cytozolowymi (Apaf-1 i -3) indukuje PCD [52]. Tworzony jest apoptosom, który w wyniku zmian konformacyjnych prowadzi do związania, oligomeryzacji i aktywacji prokaspazy-9. Czynne cząsteczki kaspazy-9 aktywują kaspazy wykonawcze (-3, -6, -7), które dokonują proteolizy białek komórkowych (mogą również aktywować prokaspazę-8), co prowadzi do załamania strukturalnego i funkcjonalnego komórek i do ich śmierci. Rozpatrując mechanizm antyapoptotycznego działania HSP70, przypuszcza się, że białka tej rodziny poprzez hamowanie uwalniania cytochromu c oraz bezpośrednią interakcję z Apaf-1 blokują aktywację kaspaz (m.in. kaspazy-9 i -3) [10,54,56,66,84]. Wykazano również, że HSP27 i HSP90 mogą blokować tworzenie się funkcjonalnego apoptosomu i w konsekwencji hamują aktywację kaspaz (przypuszczalnie przerywają wiązanie się kaspazy-9, cytochromu c i dATP) [18,29,42,108].

Białkami regulującymi przepuszczalność błon mitochondrialnych, a tym samym uwalnianie AIF z mitochondriów, są również białka z rodziny Bcl-2 oraz ich homologi. Należą do nich białka stymulujące, między innymi: Bax, Bad, Bcl-X_s, Bak, Bid oraz białka hamujące, między innymi: Bcl-2, Bcl-X_L, Bag-1, Mcl-1. Spośród wszystkich, znanych dotychczas białek komórkowych Bcl-2 jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy indukowanej przez różne czynniki. Niektórzy autorzy zaliczają nawet HSP do rodziny białek Bcl-2, gdyż wykazano, że mogą one łączyć się ze sobą (np. HSP70 i HSC70 z Bag-1) i wspólnie wywoływać antyapoptotyczne procesy w komórce [6]. Przypuszcza się, że białko Bad-1 może pośredniczyć w asocjacji HSP70 i Bcl-2, współdziałając w supresji apoptozy. Wykazano, że po działaniu różnych czynników stresogennych zwiększonej ekspresji Bcl-2 towarzyszyła indukcja HSP70 [9,18,42].

Do wewnątrzkomórkowych inhibitorów apoptozy należą również sHSP, takie jak HSP27. Wykazano, że w komórkach poddanych działaniu czynników wywołujących PCD, HSP27 blokuje błonowy receptor Fas/APO-1. HSP27 zapobiega oddziaływaniom receptora Fas/APO-1 z jego naturalnym ligandem FasL/APO-1L, nie dopuszczając do rekrutacji FADD i prokaspazy-8 oraz uformowania DISC i autoaktywacji kaspazy-8. sHSP zapobiegają też proapoptotycznym efektom stresu oksydacyjnego, etopozylu, który zatrzymuje cykl komórkowy w fazie S i G2 oraz indukuje apoptozę w komórkach normalnych i nowotworowych, a także staurosporyny – inhibitora kinazy białkowej C [9,19,29,31].

Interesujący, choć nie do końca wyjaśniony jest fakt, że antyapoptotyczne białka – HSP70 i HSP90, mogą jednocześnie wykazywać proapoptotyczne efekty w stosunku do czynników inicjujących działanie maszyny śmierci komórkowej, czyli receptorów śmierci, m.in. Fas/APO-1. Proapoptotyczne efekty wykazuje również HSP60 i HSP10. HSP60 uczestniczy w zwijaniu białek mitochondrialnych i ułatwia proteolityczną degradację źle zwiniętych lub zdenaturowanych białek, w sposób zależny od ATP. Jego opiekuńcza funkcja, a szczególnie aktywność ATP-azy jest regulowana przez

HSP10. Ponadto wykazano, że HSP60 łączy się z prokaspazami (m.in. z prokaspazą 3) i wzmacnia ich aktywację [10,29,108].

Ciekawym zagadnieniem jest również oddziaływanie HSP z białkiem p53, tzw. „strażnikiem genomu”. Białko to bierze udział w indukowaniu apoptozy, zatrzymaniu komórek w fazie G1, a także w inicjacji naprawy DNA oraz promowaniu różnicowania komórkowego. Brak p53 lub obecność jego zmutowanych form, a w konsekwencji hamowanie apoptozy, prowadzą do niestabilności genomu, zwiększenia liczby mutacji chromosomalnych, zwielokrotnienia różnych genów, co często zaburza przebieg cyklu komórkowego i może prowadzić do transformacji nowotworowej. Przyczynia się też do tego, że w komórkach z niefunkcyjnym p53 trudniej dochodzi do wywołania apoptozy przez leki cytostatyczne [14]. Dziś już wydaje się pewne, że apoptoza indukowana przez p53 pełni istotną rolę w rozwoju nowotworów *in vivo*, a sygnały mutagenne antagonizują działanie tego białka. Białko p53 aktywuje transkrypcję licznych genów, przy czym kilka kodowanych przez nie białek (p21^{WAF1}, GADD45, SIAH) związanych jest z hamowaniem cyklu komórkowego, a innych z indukcją i regulacją apoptozy [14,26,36]. Należą do nich przede wszystkim proapoptotyczne białko Bax, receptory błonowe Fas/APO-1 i receptor TNF – TRAIL, białko wiążące IGF, prawdopodobnie katepsyna D i białko p85, będące podjednostką regulatorową kinazy PI-3K, a także kilkanaście białek kodowanych przez tzw. geny PIG (*p53-induced genes*), które uczestniczą w różnych przemianach oksydoredukcyjnych. Białko p53 indukuje też transkrypcję genu cykliny G, której udział w apoptozie wydaje się ograniczać do „uczulania” komórek na sygnały apoptogenne, w tym TNF- α . Do regulacyjnego działania białka p53 należy też hamowanie ekspresji antyapoptotycznego genu Bcl-2 [19,31].

Zaobserwowano, że HSP, których podstawową właściwością jest zdolność tworzenia kompleksów z innymi białkami i modyfikowania w ten sposób ich funkcji, również wpływają na działanie „strażnika genomu” [26]. Przypuszcza się, że podczas zadziałania stresu zlokalizowany w cytoplazmie „dziki” typ p53 (p53wt) może częściowo przechodzić w formę zmutowaną (p53mut). Inicjuje to formowanie się wielocząsteczkowego kompleksu, złożonego z p53mut, HSP40, HSC70, HSP90 i białka Hop, który może stabilizować zmutowaną postać p53, a także hamować jego transport do jądra, poprzez maskowanie sygnału lokalizacji jądrowej (NLS; ang. *nuclear localisation signal*). „Dziki” typ p53 może być transportowany do jądra w obecności HSP90, które stabilizuje jego strukturę, natomiast p53mut, który nie wiąże się bezpośrednio z HSP90, tworzy w cytoplazmie niefunkcjonalne kompleksy. Dodatkowo wykazano, że HSP90 stabilizują wiązanie białka p53 do promotora genu białka p21 [2,77,111].

Dane literaturowe [14] wskazują, iż w komórkach nowotworowych, m.in. raka sutka nadekspresja HSP70 wiąże się ze złą prognozą tych nowotworów, a ponadto HSP70 tworzy kompleksy tylko ze zmutowaną formą genu p53, natomiast „dziki” typ p53 hamuje aktywność promotora genu HSP70 (poprzez wiązanie z *CCAAT box binding factor*). Nie jest rzeczą łatwą ocenić, ekspresja którego z białek indukowanych przez p53 jest najważniejsza dla indukcji i przebiegu apoptozy, gdyż zależy to od typu komórki. Podkreślić należy znaczenie oksydoreduktaz kodowanych przez kilka genów PIG i ich udział w inicjacji apoptozy, który prawdopodobnie ma polegać na stymulacji syntezy wolnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*) i wywoływaniu przez

nie uszkodzeń błon mitochondrialnych [54]. Ostatnie publikacje [1,31,42,19,76] wskazują na udział HSP70 oraz HSP27 w selektywnej ochronie komórki przed działaniem ROS (np. NO). Ponadto wykazano, że ROS są zaangażowane w proces akumulacji HSF (m.in. HSF-1), a pośrednio indukują ekspresję HSP w komórkach.

Mechanizmy ochronnego działania HSP w apoptozie nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Można przypuszczać, że niektóre z nich wynikają, między innymi, z neutralizowania przez HSP toksycznych efektów wywoływanych przez zdenaturowane białka lub wolne rodniki. Decyzja, czy komórka wejdzie w stan apoptozy, jest zależna, jak wykazano, od bardzo różnych stymulatorów o efekcie regulacyjnym [31].

PODSUMOWANIE

HSP jako białka opiekuńcze, których istotą działania jest tworzenie kompleksów z peptydami substratowymi, stanowią przedmiot zainteresowania badaczy zajmujących się konstruowaniem szczepionek przeciwnowotworowych i przeciwwzakaźnych. Podwyższony poziom przeciwciał skierowanych przeciwko własnemu HSP, zdolność niektórych HSP do modulowania procesu apoptozy w transformowanych komórkach, indukcja komórek NK oraz swoistych mechanizmów obrony humoralnej i komórkowej podczas zakażenia stwarza wiele możliwości praktycznego wykorzystania HSP w terapii i profilaktyce różnych chorób [82,110]. Najważniejszy kierunek prac nad HSP wiąże się z leczeniem nowotworów. Według badań prof. Srivastava i wsp. [95,96] białka te są w stanie wyleczyć myszy z nowotworu. Izolowano HSP z mysich komórek nowotworowych i z powrotem wstrzykiwano je zwierzętom, które nabierały odporności na nowotwór (wywoływany sztucznie, np. chemikaliami). Ponadto te myszy, które już chorowały na raka, nie miały przerzutów. To ciekawe osiągnięcie nadaje nowy, poważny charakter badaniom prowadzonym nad HSP.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADRIE CH, RICHTER CH, BACHELET M, BANZET N, FRANCOIS D. Contrasting effects of NO and peroxynitrites on HSP70 expression and apoptosis in human monocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **279**: C452–C460.
- [2] AGOFF SN, DANIEL JH, WU LB. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 1993; **259**: 84–87.
- [3] AGOSTINI I, POPOV S, LI J, DUBROVSKI L, HAO T, BUKRINSKY M. HEAT-Shock protein 70 replace viral protein R of HIV-1 during nuclear import of the viral preintegration complex. *Exper Cell Res* 2000; **259**: 398–403.
- [4] ANDREWS JM, OGLESBEE MJ, TREVINO AV, GUYOT DJ, NEWBOUND GC, LAIMORE MD. Enhanced human T-Cell Lymphotropic Virus Type I expression following induction of the cellular stress response. *Virology* 1995; **208**: 816–820.
- [5] ANG D, LIBEREK K, SKOWYRA D, ŻYLICZ M. Biological Role and Regulation of the Universally Conserved Heat Shock Protein. *J Biol Chem* 1991; **266**: 24233–24236.
- [6] ARRIGO AP. Hsp as novel regulations of programmed cell death and tumorigenicity. *Path Biol* 2000; **28**: 280–288.
- [7] BAGER GN. Host defence, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 113–126.
- [8] BECKER J, CRAIG EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 1994; **219**: 11–23.
- [9] BEERE H. Stressed to Death: Regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Science* 2001; 93:RE1.

- [10] BEERE HM, WOLF BB, CAIN K, MOSSER A, MAHBOUBI A, KUWANA T, PANKAJ T, MORIMOTO RI, COHEN GM, GREEN DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 469–475.
- [11] BERESFOLD PJ, JAJU M, FRIEDMAN RS, YOON M, LIEBERMAN J. A Role of heat shock protein 27 in CTL-mediated cell death. *J Immunol* 1998; **161**: 161–167.
- [12] BLACHERE NE, LI Z, CHANDAWARKAR RY, SUTO R, JAIKARIA NS, BASU S, UDONO H, SRIVASTAVA PK. Heat shock protein - peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific Cytotoxic T Lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 1997; **186**: 1315–1322.
- [13] CHEN D, ANDROLEWICZ MJ. Heat shock protein 70 moderately enhances peptide binding and transport by the transporter associated with antigen processing. *Immunol Lett* 2001; **75**: 143–148.
- [14] CHEN Y, LIN-SHIAU S, LIAN J. Involvement of Heat-shock Protein 70 and p53 protein. Attenuation of UVC-Induced apoptosis by thermal Stress in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Photochem Photobiol* 1999; **70**: 78–86.
- [15] CIOCCA DR, OESTERREICH S, CHAMNESS C, MCGUIRE WL, FUQUA SA. Biological and clinical implications of heat shock protein 27 000 (Hsp27): a Review. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 1558–1570.
- [16] CIUPITU AT, PETERSSON M, O'DONNELL CL, WILLIAMS K, JINDAL S, KIESSLING R, WELSH RM. Immunization with a Lymphocytic Choriomeningitis Virus Peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific Cytotoxic T Lymphocytes. *J Exp Med* 1998; **187**: 685–691.
- [17] CLARK BD, BROWN IR. Axonal transport of a heat shock protein in rabbit visual system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 1281–1285.
- [18] CREAGH EM, CARMODY RJ, COTTER TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T Cell. *Exp Cell Res* 2000; **257**: 58–66.
- [19] CREAGH EM, SHEEHAN D, COTTER TG. Heat shock proteins – modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia* 2000; **14**: 1161–1173.
- [20] DE MARCO A, CARATTOLI A, ROZERA C, FORTINI D, GIORGI C, BELARDO G, AMICI C, SANTORO G. Induction of the heat-shock response by antiviral prostaglandins in human cells infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Biochem* 1998; **256**: 334–341.
- [21] DENAGEL DC, PIERCE SK. A case for chaperones in antigen processing. *Immunol Today* 1992; **13**: 86–89.
- [22] DOCKERELL DH. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *J Infec* 2001; **42**: 227–234.
- [23] DUINA A, CHANG H, MARSH J, LINDQUIST S. A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* 1996; **274**: 1713–1717.
- [24] FEDER JH, ROSSI JM, SOLOMON J, SOLOMON N, LINDQUIST S. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *EMBO J* 1992; **11**: 2357–2364.
- [25] GALEA-LAURI J, RICHARDSON AJ, LATCHMAN DS, KATZ DR. Increased Heat Shock Protein 90 (hsp90) Expression Leads to Increased Apoptosis in the Monoblastoid Cell Line U937 Following Induction with TNF- α and Cycloheximide. *J Immunol* 1996; **157**: 4109–4118.
- [26] GAO C, ZOU Z, XU L, SETH P, SRIVASTAVA S. P53-Dependent induction of heat shock protein 27 (HSP27). *Exp Int J Cancer* 2000; **88**(2): 191–194.
- [27] GEORGOPOULOS C, GEORGIU M, SELZER G, EISEN H. Bacteriophage T4 mutant which propagate on *E. coli* K12 but not on *E. coli* B. *Experientia* 1977; **15**: 33:1157–1158.
- [28] GEORGOPOULOS C. A new bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication. *Mol Gen Genet* 1977; **28**,151: 35–39.
- [29] GERRIDO C, GURBUXANIS, RAVAGNAN L, KROEMER G. Heat shock protein: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Bioch Bioph Comm* 2001, **286**: 433–442.
- [30] GLOTZER JB, SALTIK M, CHIOCCA S, MICHPU A, MOSELEY P, COTTEN M. Activation of heat shock response by adenovirus is essential for virus replication. *Nature* 2000; **407**: 207–211.
- [31] GRZELAKOWSKA-SZTABER B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **27**(15): 9–43.
- [32] GUZIK K, BZOWSKA M, DOBRUCKI J, PRYJMA J. Heat-Shocked Monocytes are resistant to *Staphylococcus aureus*-induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of HSP27. *Infect Immun* 1999; **67**(8): 4216–4222.
- [33] HARTL FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; **381**: 571–579.
- [34] HEDSTROME R, CULPEPPER J, SCHINSKI V, AGABIAN N, NEWPORT G. Schistosome heat-shock proteins are immunologically distinct host-like antigens. *Mol Bioch Parasitol* 1988; **29**: 275–282.
- [35] HITOTSUMATSU T, IWAKI T, FUKUI M, TATEISHI J. Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (Heat Shock Protein 27 and α B-Crystallin) in human brain tumors. *Cancer* 1996; **77**: 352–361.

- [36] HUANG LC, CLARKIN KC, WAHL GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4827–4832.
- [37] HUANG Q, RICHMOND J, SUZUE K, EISEN H, YOUNG RA. *In Vivo* Cytotoxic T Lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4⁺ T Cell independent. *J Exp Med* 2000; **191**: 403–408.
- [38] ISHII T, UDONO H, YAMANO T, OHTA H, UENAKA A, ONO T, HIZUTA A, TANAKA N, SRIVASTAVA PK, NAKAYAMA E. Isolation of MHC Class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90 and gp96. *J Immunol* 1999; **162**: 1303–1309.
- [39] JÄÄTTELÄ M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 1999; **31**: 261–271.
- [40] JACOB U. HSP90 – news from the front. *Frontiers in Bioscience* 1996; **1**: 309–317.
- [41] JAKUBOWICZ-GIL J, GAWRON A. Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 267–283.
- [42] JOLLY C, MORIMOTO RI. Role of the Heat shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 1564–1572.
- [43] JONES DB, COULSON AFW, DUFF GW. Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. *Immunol Today* 1993; **14**: 115–118.
- [44] KARLIN S, BROCCIERI L. Heat shock protein 60 sequence comparisons: Duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11348–11353.
- [45] KARUPIAH G, FREDRICKSON TN, HOLNES KL, KHAIRALLAH LH, BULLER RML. Importance of interferons in recovery from mousepox. *J Virol* 1994; **67**: 4214–4226.
- [46] KATO M, KONINKX J, SCHUMACHER U. Heat shock protein expression in human tumors grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Letters* 2000; **161**: 113–120.
- [47] KAUFMANN HE. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990; **11**: 129–136.
- [48] KAUFMANN HE. Heat-shock protein and pathogenesis of bacterial infections. *Springer Semin Immunopathol* 1991; **13**: 25–35.
- [49] KAWIAK J, HOSER G. Niektóre mechanizmy immunologiczne w nowotworach. Immunoterapia nowotworów w modelach zwierzęcych oraz w klinice. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 91–118.
- [50] KLEIN S, BRÜNE B. Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release. *Biochem J* 2002; **362**: 635–641.
- [51] KRAWCZYK Z, LISOWSKA K. Regulacja ekspresji genów szoku termicznego *hsp70i*. *Post Biochem* 2000; **46**: 24–37.
- [52] KRZYŻOWSKA M, NIEMIAŁTOWSKI M. Supresja apoptozy w zakażeniach Chordopokswirusami. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 273–291.
- [53] KUHL NM, RENSING L. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 450–463.
- [54] KUMAR S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1060–1066.
- [55] KUMARAGURU U, GIERYŃSKA M, NORMAN S, BRUCE BD, ROUSE BT. Immunization with Chaperone-Peptide Complex Induces Low-Avidity Cytotoxic T Lymphocytes Providing Transient Protection against Herpes Simplex Virus Infection. *J Virol* 2002; **76**: 136–141.
- [56] LI CH, LEE J, KO Y, KIM J, SEO J. Heat shock protein 70 Inhibits Apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**: 25665–25671.
- [57] LIBEREK K. Regulacja odpowiedzi szoku termicznego *Escherichia coli*. *Post Bioch* 1995; **41**: 94–101.
- [58] LIBEREK K, MARSZAŁEK J, ANG D, ŻYLICZ M. *Escherichia Coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2874–2878.
- [59] LISOWSKA K, KRAWCZYK Z. Rodzina genów stresu *hsp70* ssaków. *Post Bioch* 1998; **44**: 179–192.
- [60] LOPEZ-GUERRERO JA, LOPEZ-BOTE JP, ORTIZ MA, GUPTA R. Modulation of adjuvant arthritis in Lewis rats by recombinant Vaccinia Virus expressing the human 60-Kilodalton heat shock protein. *Inf Immun* 1993; **61**: 4225–4231.
- [61] MA J, LINDQUIST S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrPSc-like conformation in the cytosol. *Science* 2002; **298**(5599): 1785–1788.
- [62] MANNICK JB. The antiviral role of nitric oxide. *Res Immunol* 1995; **146**: 693–707.
- [63] MAYR M, KIECHL S, WILLEIT J, WICK G, XU Q. Infections, immunity, and atherosclerosis. Associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and Cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral Atherosclerosis. *Circulation* 2000; **102**: 833–839.
- [64] MENORET A, CHANDAWARKAR RY, SRIVASTAVA PK. Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *Immunology* 2000; **101**: 364–370.

- [65] MOCARIO AJ, CONWAY DE MACARIO E. Stress and molecular chaperones in disease. *Int Clin Lab Res* 2000; **30**: 49–66.
- [66] MORIMOTO RJ. Cell in Stress: Transcriptional activation of heat shock gene. *Science* 1993; **259**(5): 1409–1410.
- [67] MOSSER DD, CARON AW, BOURGET L, MERLIN A, SHERMAN M, MORIMOTO R. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 7146–7159.
- [68] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **2**: 315–334.
- [69] MYCKO MP, ĆWIKLIŃSKA H, SZYMAŃSKI J, KUDLA G, KILIANEK Ł, SELMAJ KW. Inducible Heat Shock Protein 70 Promotes Myelin Autoantigen Presentation by the HLA Class III. *J Immunol* 2004; **172**: 202–213.
- [70] NEWMAN GP, WĘDRZYN RD, LINDQUIST S, CHERNOFF YO. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1325–1333.
- [71] NIEWIAROWSKA J, D'HALLUIN J, BELIN MT. Adenovirus capsid proteins interact with HSP70 proteins after penetration in human or Rodent Cells. *Exp Cell Res* 1992; **201**: 408–416.
- [72] NISHIMURA RN, DWYER BE. Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Mol Brain Res* 1996; **36**: 227–239.
- [73] NISHIMURA RN, SANTOS D, ESMAILI L, FU ST, DWYER BE. Expression of antisense hsp70 is a major determining factor in heat-induced cell death of P-19 carcinoma cells. *Cell Stress Chaper* 2000; **5**: 173–180.
- [74] NISOLI E, REGIANINI L, BULBARELI A, BRISCINI L, CARRUBA O. Protective effects of noradrenaline against tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in cultured rat brown adipocytes: role of nitric oxide-induced heat shock protein 70 expression. *Inter J Obes* 2001; **25**: 1421–1430.
- [75] NOWORYTA J. Zakażenia bakteryjne i ich rola w indukcji i przebiegu chorób reumatycznych. *Reumatologia* 1996; **34**: 800–811.
- [76] OGLESBEE M, KRAKOWKA S. Cellular stress response induces selective intranuclear trafficking and accumulation of morbillivirus major core protein. *Lab Invest* 1993; **68**: 109–117.
- [77] PANJWANI NN, POPOVA L, SRIVASTAVA PK. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of Nitric Oxide by APCs. *J Immunol* 2002; **168**: 2997–3003.
- [78] PARK CS, JOO IS, KIM DS, BAE DS, LEE JH. An immunohistochemical analysis of heat shock protein 70, p53 and estrogen receptor status in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1999; **74**: 53–60.
- [79] PERSELL DA, LINDQUIST S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet* 1993; **27**: 437–496.
- [80] POLLA B. A role for heat shock proteins in inflammation. *Immunol Today* 1988; **9**: 134–137.
- [81] PORANKIEWICZ J, GWÓŹDŹ EA. Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 155–170.
- [82] PYZA E, MAK P, KRAMARZ P, LASKOWSKI R. Heat shock protein (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol Environ Safety* 1997; **38**: 244–251.
- [83] QUINTANA FJ, ROTEM A, CARMÍ P, COHEN IR. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J Immunol* 2000; **165**: 6148–6155.
- [84] RAJDEV S, SHARP FR. Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol Pathol* 2000; **28**(1): 105–112.
- [85] RAVAGNAN L, GURBUXANTI S, SUSIN SA, MAISSE C, DAUGLAS E, ZAMZAMI N. Heat-shock protein 70 antagonized apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol* 2001; **3**: 839–843.
- [86] RENKAWEK K, STEGE GJJ, BOSMAN GJ. Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and α B-crystallin in Parkinson's disease. *NeuroRaport* 1999; **10**: 2273–2276.
- [87] RÓŹALSKA B, RUDNICKA W, KRAJEWSKA-PIETRASIK D. Bakterie - mikroorganizm, wzajemne oddziaływanie stresogenne. *Post Mikrobiol* 1995; **4**: 417–432.
- [88] RUSSEL AD. Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science Progress* 2003; **86**: 115–137.
- [89] SANTORO MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Bioch Pharmacol* 2000; **59**: 55–63.
- [90] SARGENT CA, DUNHAM I, TROWSDALE J, CAMPBELL RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1968–1972.
- [91] SCHEIBEL T, BLOOM J, LINDQUIST S. The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2287–2292.
- [92] SCHIRMBECK R, REIMANN J. Peptide transporter-independent, stress protein-mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 1478–1486.

- [93] SCHIRMER EC, LINDQUIST S. Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13932–13937.
- [94] SHINNICK TM. Heat Shock Proteins as Antigens of Bacterial and Parasitic Pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; **167**: 145–160.
- [95] SOMERSAN S, LARSSON M, FONTENEAU JF, BASU S, SRIVASTAVA P, BHARDWAJ N. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2001; **167**: 4844–4852.
- [96] SRIVASTAVA KP. Heat shock proteins in immune response to cancer: The Fourth Paradigm. *Experimenta* 1994; **50**: 1054–1060.
- [97] SRIVASTAVA PK. Peptide-binding heat shock protein in the endoplasmic reticulum: Role in immune response to cancer and in antigen presentation. *Adv Cancer Res* 1993; **62**: 153–177.
- [98] SULEJCZAK D. Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 527–568.
- [99] SUTO R, SRIVASTAVA PK. A Mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995; **269**: 1585–1588.
- [100] TAMURA Y, PENG P, LIU K, DAOU M, SRIVASTAVA PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock proteins preparations. *Science* 1999; **284**: 819–822.
- [101] TODRYK S, MELCHER A, HARDWICK N, LINARDAKIS E, BATMAN A, COLOMBO MP. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol* 1999; **163**: 1398–1408.
- [102] TODRYK SM, MELCHER AA, DALGLEISH AG, VILE RG. Heat shock proteins refine the danger theory. *Immunology* 2000; **99**: 334–337.
- [103] UDONO H, SRIVASTAVA PK. Heat Shock Protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 1993; **178**: 1391–1396.
- [104] VANBUSKIRK A, CRUMP BL, MARGOLIASH E, PIERCE SK. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 Heat Shock Family. *J Exp Med* 1989; **170**: 1799–1809.
- [105] WADHWA R, KAUL SC, IKAWA Y, SUGIMOTO Y. Identification of a novel member of mouse hsp70 Family. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6615–6621.
- [106] WEBER MHW, MARATIEL M. Bacterial cold shock response. *Science Progress* 2003; **86**: 9–75.
- [107] WEDLING U, LIESBETH P, RUURD VAN DER ZEE, PRAKKEN B. A Conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T Cell that cross-react with the mammalian self-hsp 70 homologue. *J Immunol* 2000; **164**: 2711–2717.
- [108] WILLEM VAN EDEN Stress proteins as target anti-inflammatory therapies. *Therapeutic focus* 2000; **5**: 114–120.
- [109] XANTHOUDAKLS S, NICHOLSON D. Heat-shock proteins as death determinants. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 163–165.
- [110] YOUNG RA, ELLIOTT TJ. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 1989; **59**: 5–8.
- [111] ZUGEL U, KAUFMANN S. Immune response against heat shock protein in infectious diseases. *Immunobiol* 1999; **201**: 22–35.
- [112] ŻYLICZ M, KING FW, WAWRZYNOW A. Hsp70 interreactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J* 2001; **20**: 4634–4638.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 15.12.2003 r.

Przyjęto: 12.03.2004 r.

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

IMPRINTING GENOMOWY U ROŚLIN

GENOMIC IMPRINTING IN PLANTS

Elżbieta KUTA¹, Joanna ROJEK²

¹Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie;

²Zakład Genetyki i Cytologii, Uniwersytet Gdański w Gdańsku

Streszczenie: Zjawisko imprintingu genomowego występuje zarówno u zwierząt (ssaków), jak i roślin (roślin kwiatowych) i polega na pozornie nierównocennej ekspresji alleli genów pochodzących od ojca i matki u osobników potomnych; allele pochodzące od jednego z rodziców są wyciszone. Niniejszy artykuł przedstawia zagadnienia związane z imprintingiem genomowym u roślin. U roślin kwiatowych zarodek i bielmo powstają w wyniku podwójnego zapłodnienia, procesu charakterystycznego tylko dla tej grupy roślin. Imprinting genomowy u roślin odnosi się do rozwoju bielma, a nie zarodka w przeciwieństwie do zwierząt, u których konsekwencją imprintingu jest nieżywotność zarodków ssaczych powstałych jednorodzicielsko, czyli przy udziale jedynie jednego genomu – męskiego (androgeneza) bądź żeńskiego (partenogeneza/gynogeneza). Na podstawie badań genetycznych i molekularnych wykryto istnienie tzw. genów wykazujących efekt matczyny, ulegających ekspresji w diploidalnym sporoficie lub w haploidalnym żeńskim gametoficie. Zidentyfikowano kilka takich genów odpowiedzialnych za rozwój nasion u *Arabidopsis* i *Zea*. Od kilku lat największe zainteresowanie budzi grupa genów opisanych dla *Arabidopsis*: *MEDEA* (*MEA*), *FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED2* (*FIS2*) i *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM* (*FIE*), które są odpowiedzialne za zablokowanie podziałów jądra komórki jajowej i komórki centralnej przed zapłodnieniem. Badania wczesnych stadiów embriogenezy u *Arabidopsis* wykazały, że ekspresja alleli ojcowskich jest opóźniona w czasie rozwoju nasion dzięki imprintingowi genomowemu. Z danych tych wynika, że przy braku ekspresji alleli ojcowskich, pierwsze podziały zygoty są pod wyłączną kontrolą alleli matczynych. Zróznicowaną ekspresję matczynych i ojcowskich alleli wykryto w przypadku 20 genów u *Arabidopsis*, ulegających ekspresji podczas wczesnych etapów rozwoju nasion. Mechanizmem odpowiedzialnym za imprinting u roślin są, podobnie jak postulowano dla zwierząt, zmiany w metylacji cytozyny, ale także paramutacje i wyciszanie transgenowe. Przedstawiono również znaczenie imprintingu genomowego w rozmnażaniu roślin, a szczególnie w apomiksji.

Słowa kluczowe: rośliny, genomowy imprinting, metylacja DNA, białka Polycomb, bielmo, zarodek, apomiksja.

Summary: The epigenetic phenomenon of genomic imprinting occurs among both plants (flowering plants) and animals (mammals) reflecting as parent-of-origin effects on the expression of imprinted genes in offspring. Imprinting results in non equivalent expression of maternally and paternally derived

alleles in an individual. It means that one of the alleles is suppressed during development in sex-specific manner. This reviews focuses on imprinting in plants. Embryo and endosperm in flowering plants are the result of double fertilization, a special event characteristic for this group of plants only. Imprinting in plants affects the endosperm development but not the embryo development in contrast to mammals where the consequence of imprinting is inviability of embryos with uniparental genome (male or female) contribution (androgenic embryos, parthenogenetic/gynogenetic embryos, respectively). There is molecular and genetic evidence for so-called maternal-effect genes expressed in both diploid sporophyte and in haploid female gametophyte. Several such genes involved in seed development were described in *Arabidopsis* and in *Zea*. Most interest was placed on the group of *Arabidopsis* genes *MEDEA* (*MEA*), *FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED2* (*FIS2*) and *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM* (*FIE*) responsible for the suppression of an egg cell and central cell nucleus divisions before fertilization. Analysis of early embryogenesis in *Arabidopsis* clearly indicated that the expression of paternal alleles is delayed during seed development being an effect of genomic imprinting. It is thus obvious that in the absence of paternally inherited alleles, early divisions of zygote are programmed by maternal copies. Differential expression of paternal and maternal alleles was stated for 20 genes in *Arabidopsis* expressed in early seed development. Mechanism of imprinting in plants are considered to be cytosine methylation and chromatine condensation similarly as is postulated in animals but also paramutations and transgene silencing could be involved in imprinting in plants. The role of imprinting in plant reproduction specially in apomixis is also presented.

Key words: plants, genomic imprinting, DNA methylation, Polycomb proteins, embryo, endosperm, apomixis.

WSTĘP

Imprinting genomowy, czyli rodzicielskie piętno genomowe oznacza zróżnicowaną inaktywację odcinków DNA w genomach ojca i matki, czego wynikiem jest pozornie nierównocenny materiał genetyczny pochodzący od matki i od ojca. Termin imprinting, w sensie genetycznym, został użyty po raz pierwszy w 1960 roku przez Helenę Crouse w odniesieniu do zjawisk zachodzących w pierwszych etapach rozwoju embrionalnego u owadów z rzędu *Diptera*.

Imprinting rodzicielski wymaga epigenetycznych znaczników alleli w linii płciowej, utrzymania się tych markerów podczas podziału komórki oraz ścisłej ich specyficzności objawiającej się jednorodzielską ekspresją genu po zapłodnieniu. Markery funkcjonujące u ssaków są wyciszane w primordialnych komórkach germalnych (*Primordial Germ Cells* – PGCs) i przywracane ponownie podczas gametogenezy (np. spermatocyty II rzędu i spermatydy już mają nałożony wzór charakterystyczny dla płci) zgodnie z płcią zwierzęcia. Monoalleliczna ekspresja naznaczonych genów jest utrzymywana przez epigenetyczne mechanizmy regulacyjne, takie jak: metylacja DNA i przemodelowanie chromatyny, czego dowodem są modyfikacje wywołane przez geny wpływające na metylację DNA (np. *DNA METHYLTRANSFERASE-MET1*) [12], deacetylację histonów (np. *HISTONE DEACETYLASE COMPLEX – HDAC*) [58] i przemodelowanie chromatyny (np. *DECREASE IN DNA METHYLATION1 – DDM1* i *MORPHEUS' MOLECULE1 – MOM1*) [19,20]. Demetylacja DNA jest uznawana za pierwotny wyznacznik rozpoczynającej się ekspresji [4,54]. Znaczenie zmian metylacji cytozyny w różnicowaniu się komórek u roślin i regulacji ekspresji genów zostało

omówione w artykułach przeglądowych [np. 12,37,38]. Zaproponowany przez Melisę Spielman [54] termin “epiplęć” (*epigender*), a przez innych “płciowo-specyficzny epigenotyp” ma charakteryzować genomy ojcowski i matczyzny, które są określane przez płciowo-specyficzne naznaczenie genów ulegających imprintingowi. Epiplęć może być modyfikowana w sposób naturalny lub eksperymentalnie i może ulegać zmianom w ciągu cyklu życiowego organizmów będących nośnikami imprintingu genomowego; stąd wniosek, że to imprinting ustala epiplęć. Inaczej mówiąc epiplęć zależy od imprintingu i pojęcia te nie mogą być traktowane jako synonimy.

W niniejszym artykule spróbujemy odpowiedzieć na dwa zasadnicze pytania: (1) czy imprinting genomowy występuje u roślin? A jeżeli tak, to (2) czy imprinting genomowy w równej mierze dotyczy rozwoju zarodka, jak i bielma?

Pierwsze doniesienia o występowaniu imprintingu genomowego u roślin kwiatowych pochodzą z badań nad rozwojem nasion powstałych w wyniku krzyżowań między-ploidalnych (zob. [5,18] i cyt. tam lit.). Z danych tych wynika, że u wielu gatunków roślin krzyżowanie osobników na różnym stopniu ploidalności, np. $2x \times 4x$ lub $4x \times 2x$ prowadzą do zakłóceń w prawidłowym rozwoju nasion bądź do obumierania nasion.

U większości roślin kwiatowych rozwój nasion jest inicjowany przez podwójne zapłodnienie, podczas którego jedna komórka plemnikowa zapładnia komórkę jajową, natomiast druga komórka plemnikowa wnika do komórki centralnej, gdzie najczęściej ulega fuzji z jądrem wtórnym. Zarówno komórka jajowa, jak i komórka centralna są identyczne pod względem genetycznym, bowiem pochodzą najczęściej od tej samej megaspori. Podobnie, dwie komórki plemnikowe są pochodnymi tej samej mikrospori. W konsekwencji podwójnego zapłodnienia (w najbardziej rozpowszechnionym typie *Polygonum monosporowego* woreczka zalążkowego) powstają dwie struktury: diploidalny zarodek zawierający jeden zestaw żeńskich i jeden zestaw męskich chromosomów oraz triploidalne bielmo, w skład którego wchodzi dwa genomy żeńskie i jeden męski. Rozwój zarodka i bielma przebiega w sposób skoordynowany, a obydwie struktury znajdują się w sporofitycznych tkankach matczynych, które tworzą okrywę nasienną. Mimo wspólnego pochodzenia drogi rozwoju zarodka i bielma są różne. W ciągu ostatnich kilku lat pojawiło się wiele prac przeglądowych dotyczących podwójnego zapłodnienia u roślin kwiatowych, genetycznego podłoża procesu embriogenezy i rozwoju bielma (zob. [41,43–47,49] i cyt. tam lit.).

CHARAKTERYSTYKA EPIPLĘCI

Zgodnie z modelem reprodukcyjnym u roślin kwiatowych i u ssaków, w komórce jajowej (czy komórce centralnej w przypadku *Angiospermae*) dochodzi do ekspresji imprintowanych genów, co nadaje jej specyficzność rodzicielską. Genom z ojcowskim epigenotypem ma możliwość ekspresji wszystkich genów, które normalnie byłyby aktywne podczas ich deponowania przez plemnik do komórki jajowej z wyjątkiem genów, które ulegają ekspresji, wyłącznie jeżeli pochodzą od matki. Podobnie, w przypadku

matczynego epigenotypu istnieje możliwość ekspresji wszystkich tych genów, które są aktywne wtedy, gdy są wnoszone przez komórkę jajową (u ssaków) lub komórkę centralną (u *Angiospermae*). Wyniki eksperymentalnych manipulacji i mutacji wskazują, że epipląc matczyna i ojcowska są nie tylko stanami, jakie może osiągnąć genom, ale reprezentują końcowy efekt spektrum, w którym możliwe jest wystąpienie również stanów pośrednich [54]. Zakres tego spektrum jest charakterystyczny dla gatunku, ale różni się między gatunkami, co ma odbicie w różnej "sile imprintingu";, wykazano to krzyżując gatunki *Angiospermae* o odmiennych stosunkach genomów w bielmie (*Endosperm Balance Number* – EBN). Krzyżowanie może również zaburzyć system stabilizacji i odpowiedzi na epipląc, na co wskazują wyniki eksperymentów u myszy płowych.

W modelu rozwojowym ssaków można wyróżnić trzy podstawowe stany genomów w odniesieniu do naznaczników płciowych (zob. [54] i cyt. tam lit.):

Stan 1 – diploidalny: primordialna komórka germinalna znajduje się na etapie wymazania imprintingu, ale przed wpisaniem jego nowego wzoru; tzw. pre-m (*pre-maternal*) i pre-p (*pre-paternal*) genomy. Nie jest to jednak kompletnie "nagie" stadium, w którym każdy gen przeznaczony do imprintingu ma potencjalną zdolność do ekspresji, ponieważ pewne loci wymagają do aktywacji procesu imprintingu;

Stan 2 – haploidalny: stanowią go gamety z nałożonym nowym wzorem imprintingu matczynego (m) lub ojcowskiego (p), w zależności od płci organizmu, w którym są wytwarzane;

Stan 3 – diploidalny: komórki somatyczne po zapłodnieniu; zawierają po jednym genomie m i p. Prawidłowe proporcje genomów m i p stanowią punkt krytyczny dla normalnego rozwoju organizmu.

Analogiczny model można zaproponować dla roślin kwiatowych, chociaż wiele szczegółów musi zostać pominiętych, bowiem ciągle niewiele wiadomo, kiedy następuje wymazanie imprintingu i nałożenie go na nowo. W tej grupie roślin bielmo stanowi tkankę, dla której stan 3 jest krytyczny; wymagany do normalnego rozwoju stosunek genomów matczynego (m) do ojcowskiego (p) wynosi 2:1 [54].

IMPRINTING GENOMOWY A ROZWÓJ ZARODKA

Z danych dotyczących rozwoju zarodka u ssaków i roślin kwiatowych można wyciągnąć ogólny wniosek dotyczący roli imprintingu genomowego w jego rozwoju u tych dwóch grup organizmów. Dowodów dostarczają zarodki, które powstały 'jednorodzielsko', tzn. przy udziale jedynie jednego zestawu genomu: matczynego lub ojcowskiego, czyli w drodze partenogenetycznego rozwoju komórki jajowej, androgenezy czy gynogenezy. Rozwój takich zarodków jest odmienny u roślin i ssaków.

U ssaków, jeżeli nawet udało się zaindukować rozwój zarodka na jednej z wymienionych dróg, to jego rozwój był zahamowany i w konsekwencji zarodki ulegały aborcji. Z badań nad myszami wynikało, że fenotypy wszystkich trzech typów zarodków wykazywały tzw. efekt pochodzenia rodzicielskiego (*parent-of-origin effect*). Zarodki

partenogenetyczne i gynogenetyczne (materiał genetyczny pochodził wyłącznie od matki) przechodziły pierwsze etapy rozwoju, ale potem zamierały z powodu niedorozwoju trofoblastu i błon płodowych. W przypadku zarodków androgenicznych (materiał genetyczny pochodził wyłącznie od ojca) sytuacja była przeciwna, tzn. początkowo rozwój zarodków przebiegał normalnie, ale potem zamierały one z powodu niedorozwoju samego zarodka, a nie braku substancji odżywczych; trofoblast oraz błony płodowe były normalnie rozwinięte (zob. [4,60,64] i cyt. tam lit.).

U wielu gatunków roślin kwiatowych, zarodki powstałe z udziałem wyłącznie genomu jednego z rodziców są żywotne. Przykładem mogą być rośliny apomiktyczne, wśród których wyróżnia się tzw. apomikty autonomiczne, u których rozwój zarodka i bielma odbywa się autonomicznie, czyli bez udziału gamet męskich oraz apomikty pseudogamiczne, u których zarodek rozwija się partenogenetycznie z diploidalnej komórki jajowej, natomiast do rozwoju bielma potrzebne jest zapłodnienie komórki centralnej. Zagadnienia te zostały ostatnio podsumowane w kilku pracach przeglądowych (zob. [7,24,25,27,49,55] i cyt. tam lit.). Wśród roślin rozmnażających się płciowo, w warunkach *in situ*, rzadko spotyka się partenogenetyczny rozwój komórki jajowej. Rośliny jednorodzielskie mateczne można uzyskać również w warunkach eksperymentalnych, w drodze gynogenezy (terminy gynogeneza i androgeneza stosowane w odniesieniu do roślin nie dotyczą tych samych zjawisk jak w przypadku zwierząt) w wyniku zapylenia nieaktywnym, napromieniowanym pyłkiem, zapyleniu oddalonych, jak również w kulturze niezapłodnionych organów żeńskich (izolowane zalążnie, zalążki). Uzyskanie roślin w drodze gynogenezy sprawia ciągle trudności metodyczne [34]. Powyższe dane wskazują na niezależną rolę matecznych transkryptów w kierowaniu wczesnymi etapami rozwoju zarodka; spontaniczne podziały komórki jajowej odbywają się bez fuzji z komórką plemnikową. Innymi słowy komórka jajowa roślin kwiatowych, niezależnie od zapłodnienia, ma potencjalną zdolność do inicjowania programu rozwojowego zarodka wykorzystując mateczne transkrypty. Z drugiej strony są przykłady rozwoju zarodków bez udziału transkryptów matecznych, np. indukcja struktur zarodkopodobnych w kulturze *in vitro* różnych tkanek somatycznych (somatyczna embriogeneza) bądź rozwój zarodkopodobnych struktur z mikrospor (androgeneza). Można stąd wysunąć wniosek przeciwny, że mateczne transkrypty nie są potrzebne do wczesnych podziałów zygoty [47], jakkolwiek na fundamentalne pytanie o rolę matczyńskich transkryptów we wczesnych etapach rozwoju bielma i zarodka u roślin kwiatowych ciągle nie ma jednoznacznej odpowiedzi.

Z zaprezentowanych powyżej danych wynika, że konsekwencją imprintingu genomowego u ssaków jest nieżywotność zarodków powstałych wyłącznie przy udziale jednego genomu rodzicielskiego, natomiast wpływ imprintingu na rozwój jednorodzielskich zarodków u roślin kwiatowych jest słaby. U roślin kwiatowych imprinting genomowy nie działa zatem bezpośrednio na rozwój zarodka, natomiast pośrednio ma wpływ na rozwój zarodka przez oddziaływanie na rozwój bielma.

TEORIA KONFLIKTU RODZICÓW

Istnieje kilka hipotez próbujących tłumaczyć ewolucyjną rolę imprintingu genomowego, z których najbardziej powszechna jest tzw. teoria konfliktu rodziców. W myśl tej teorii imprinting genomowy jest rodzajem “walki” pomiędzy genomami (matczynym i ojcowskim) o alokację w genomie potomstwa [2,18,32,33,51,64]. W modelu tym presja selekcyjna wytworzona dla promotorów wzrostowych, aktywna podczas deponowania substancji w zarodku, ulega ekspresji, gdy pochodzi od ojca, ale jest wyciszana, jeżeli jest pochodzenia matczynego.

U ssaków wiele loci genowych podlegających imprintingowi funkcjonuje w ciągu życia płodowego, a ich rola jest szczególnie ważna w rozwoju łożyska [4,54,59]. Zwiększający się udział genomu męskiego (dawka aktywnych kopi genów naznaczonych ojcowsko) najczęściej prowadzi do rozrostu łożyska, podczas gdy wzrost udziału genomu matczynego wywołuje odwrotny efekt.

U roślin kwiatowych uznaje się teorię konfliktu rodzicielskiego w odniesieniu do rozwoju i wzrostu bielma, tkanki, która pośredniczy w transferze substancji odżywczych pomiędzy rośliną mateczną a zarodkiem. Teoria ta postuluje istnienie dwóch typów genów:

(1) genów o ekspresji matczynej (ojcowsko imprintowane), których rola polega na “sprawiedliwym” rozprowadzeniu matczynych zasobów do nasion (*Maternal Conflict Genes – MCGs*) oraz

(2) genów o ekspresji ojcowskiej (matecznie imprintowane), których rolą jest doprowadzenie do maksymalnego wzrostu nasion [8].

Wyniki badań nad *Arabidopsis* i innymi gatunkami uzyskane przy krzyżowaniach osobników na różnych stopniach ploidalności potwierdziły założenia teorii konfliktu rodzicielskiego [18]. W przypadku *Arabidopsis thaliana* nadwyżka ojcowskich genomów wprowadza dodatkową dawkę alleli wykazujących ekspresję jednorodzielską (promujące rozwój bielma), które są odpowiedzialne za zwiększenie rozmiarów nasion, podczas gdy nadmiar genomów matczynych jest odpowiedzialny za ograniczenie rozwoju nasion przez wniesienie dodatkowych alleli hamujących rozwój nasion [64].

STOSUNEK GENOMOWY

Każda komórka zarodka ssaka i otaczających go błon zawiera jeden genom z matczynym epigenotypem (m) i jeden genom z epigenotypem ojcowskim (p). Eksperymenty, w których konstruowano mysie zarodki używając dwóch męskich lub dwóch żeńskich przedjądrzy, wykazały, że do prawidłowego rozwoju zarodka konieczny jest udział przedjądrzy obojga rodziców. Powstałe zarodki androgeniczne (0m:2p) i gynogeniczne (2m:0p) ulegały aborcji, odpowiednio przy dobrze lub słabo rozwiniętych błonach płodowych [54]. Możliwość powstawania żywotnych androgenicznych

zarodków jest jednak znana na przykład u gatunku ryby *Danio rerio* (zob. [54] i cyt. tam lit.), u którego nie występuje system imprintingu rodzicielskiego. W tym przypadku, genomy pochodzące od plemnika i komórki jajowej mają potencjalną zdolność do zmiany płci w zygocie.

Podobnie jak w przypadku ssaków, rośliny kwiatowe są wrażliwe na równowagę genomów rodzicielskich. Krzyżowanie osobników o różnych stopniach ploidalności najczęściej prowadzi do nienormalnego rozwoju nasion, czego konsekwencją jest degeneracja zarodków oraz zmienny fenotyp bielma zależny od kierunku krzyżowania [18,21].

U większości gatunków rozmnażających się płciowo normalny rozwój bielma zależy od prawidłowego stosunku genomów 2:1 (2 matczyne :1 ojcowski). U *Arabidopsis*, w wyniku krzyżowania diploidów i tetraploidów powstawały triploidalne zarodki oraz bielmo, którego rozwój zależał od kierunku krzyżowania: jeżeli diploidalny był organizm matczynej ($2x \times 4x$) dochodziło do nadprodukcji bielma; w przypadku krzyżowania odwrotnego powstające bielmo było znacznie zredukowane [52]. Krzyżowanie diploidów i heksaploidów dawało podobne fenotypy, przy czym odchylenia od normy były dużo większe, a zarodki na ogół obumierały. Stąd u *Angiospermae* efekt pochodzenia rodzicielskiego interpretuje się jako zmianę w równowadze aktywnych alleli imprintowanych genów.

GENY PODLEGAJĄCE IMPRINTINGOWI U ROŚLIN KWIATOWYCH

W przeciwieństwie do ssaków, u których znanych jest wiele dobrze scharakteryzowanych genów podlegających imprintingowi, u roślin kwiatowych dane te są bardzo skąpe, dotyczą nielicznych genów, w przypadku których uznaje się bądź jedynie przypuszcza się, że podlegają imprintingowi genomowemu. Do takich genów zalicza się zarówno geny, które nie odgrywają kluczowej roli w rozwoju nasion, jak i geny odpowiedzialne za ich prawidłowy rozwój.

Geny wykazujące efekt matczynej u roślin kwiatowych

Zarówno zarodek, jak i bielmo u roślin kwiatowych rozwijają się w obrębie haploidalnego żeńskiego gametofitu otoczonego diploidalnymi matczynymi tkankami. Nie ulega wątpliwości, że procesy zachodzące po zapłodnieniu są kontrolowane przez geny wykazujące tzw. efekt matczynej. Geny te ulegają ekspresji zarówno w diploidalnym sporoficie, jak i haploidalnym gametoficie. Jedne z pierwszych doniesień o istnieniu imprintingu genomowego u roślin dotyczyły badań nad 4 loci genu *R* u kukurydzy, kodującego czynnik transkrypcyjny aktywny w regulacji biosyntezy antocyjanin w warstwie aleuronowej bielma. Do genów podlegających imprintingowi zalicza się również gen *dzr1* (*delta zein-regulator1*), gen *zein*, gen *alpha tubulin*, *floury1*, i *pH 7,5 esterase*, *floury2*, *Dap* (*defective aleurone pigmentation*) (zob. [2,64] i cyt. tam

lit.). Wymienione geny, z wyjątkiem *esterase*, są związane z funkcjami bielma bądź mają bezpośredni wpływ na rozwój bielma.

Rola sporofitycznych genów wykazujących "efekt matczyny" w rozwoju zarodka została potwierdzona na podstawie genetycznej analizy embriogenezy u recesywnego mutantu *short integuments (sin1)*, (inna nazwa *dicer-likel [dcl1]*) *Arabidopsis thaliana*. Zalążki mutantu o nienormalnie rozwiniętych osłonkach wytwarzały również nienormalne woreczki zalążkowe jako efekt zaburzonej megasporogenezy, co w efekcie doprowadzało do żeńskiej sterylności [50]. Wyniki szeregu przeprowadzonych krzyżówek, w których użyto jako roślin matczyny osobników będących homozygotami bądź heterozygotami w odniesieniu do allelu typu dzikiego *SIN1* zapylanych pyłkiem wnoszącym allel dziki lub zmutowany *sin1* wykazały, że zarodki mutantu homozygotycznego rozwijające się w woreczku zalążkowym sporofitowego mutantu heterozygotycznego są normalne. Jeżeli matczyny sporofit był mutantem homozygotycznym, defekt dotyczący głównie liścieni był widoczny w zarodkach. Z przytoczonych danych wynika, że mutacja *sin1*, wykazująca efekt matczyny, ma naturę sporofitową i że produkt genu *SIN1* może wpływać na rozwój zarodka przez wytwarzanie sygnałnych molekuł w tkankach zalążka otaczających woreczek zalążkowy. Podobnie, sporofitowy efekt matczyny wykazują 2 geny *FLORAL BINDING PROTEIN7 (FBP7)* i *FBP11* należące do kompleksu genów *MADS-box*. U transgenicznej petunii (*Petunia hybrida*) zahamowanie ekspresji tych genów prowadziło do wytwarzania nienormalnych zalążków z częściowo lub całkowicie zanikającym bielmem i zahamowanym rozwojem zarodków [10].

Drugą grupę stanowią geny gametofitowe odgrywające kluczową rolę w rozwoju nasion. Należą tutaj stosunkowo niedawno odkryte u *Arabidopsis thaliana* geny o ogólnej nazwie *Fertilization Independent Seed (FIS)*, do których zalicza się: *MEDEA/FIS1/EMB173 (Fertilization Independent Seed1)* [4,23,29,35,36], *FIS2 (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2)* [6] i *FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM)/FIS3* [29,35,36]. Geny te są odpowiedzialne za zahamowanie rozwoju nasion bez zapylenia. Każdy z wymienionych genów kontroluje 3 funkcje w czasie rozwoju bielma i odpowiada za:

- (1) represję genów wymaganych do rozpoczęcia rozwoju bielma,
- (2) organizację bielma,
- (3) liczbę podziałów jąder bielma [28].

Mutanty wykazujące utratę funkcji tych genów rozpoczynały, bez udziału podwójnego zapłodnienia, rozwój nasion wg typu zaprogramowanego dla formy dzikiej; dochodziło do rozwoju bielma jądrowego bądź komórkowego, wytworzenia okrywy nasiennej, a nawet do częściowego rozwoju zarodka. Ponieważ u formy dzikiej rozwój zarodka i bielma następuje w wyniku podwójnego zapłodnienia, uznano, że wyżej wymienione geny są supresorami podziałów komórki jajowej oraz jądra wtórnego (bądź jąder biegunowych) komórki centralnej przed zapłodnieniem. Geny te wykazują tzw. efekt matczyny, czyli ulegają ekspresji, kiedy są przekazywane drogą żeńską, natomiast są imprintowane w genomie ojcowskim. Badania nad krzyżowaniem form dzikich z mutantami dostarczyły wielu danych na temat procesów regulujących rozwój nasion. Zapylenie zalążków form zmutowanych (*mea3*) pyłkiem formy dzikiej prowadziło do zahamowania rozwoju zarodka w stadium sercowatym i nadprodukcji bielma; liczba

jąder bielma (nie dochodziło do zakładania ścian komórkowych) sięgała 150% w stosunku do formy dzikiej [23]. Podobny fenotyp uzyskano przez zapłodnienie załączków mutantu *fie* pyłkiem dzikiej formy. Mutacje *mea*, *fis2* i *fie* wykazują efekt matczyny, co oznacza, że zmutowane fenotypy obserwuje się jedynie w przypadku, kiedy zmutowane allele są przekazywane drogą żeńską. Nasiona heterozygotyczne, w których zmutowane allele pochodzą od ojca, nie wykazują efektu mutacji i ich fenotyp jest identyczny jak nasion pochodzących od homozygotycznego typu dzikiego, co wyraźnie wskazuje na to, iż te trzy geny podlegają imprintingowi ojcowskiemu, a ulegają ekspresji jedynie w genomie matczynym. Potwierdzeniem hipotezy, że allele genów *MEA* i *FIS2* w genomie bielma pochodzące od ojca są wyciszone w początkowych stadiach rozwoju nasienia, są wyniki badań nad ekspresją promotora GUS (β -glukuronidazy) przyłączonego do *FIE* lub *FIS2*, która została stwierdzona w bielmie jedynie w przypadku przekazania konstruktu drogą żeńską [29,30]. Podobnie, badania Vielle-Calzada i współautorów [60] nad ekspresją genu *MEA* w zarodku i bielmie przy użyciu hybrydyzacji *in situ*, wykazały obecność charakterystycznych sygnałów w jądrach biegunowych zarówno przed, jak i po zapłodnieniu. Obecność jedynie dwóch sygnałów po zapłodnieniu wskazuje na wyciszenie alleli pochodzących od genomu ojcowskiego; obserwowane sygnały pochodziły od dwóch genomów matczynych reprezentowanych w komórce centralnej. Allele genu *MEA* przekazywane od ojca są transkrypcyjnie wyciszone we wczesnych stadiach rozwoju zarodka i bielma. Wyciszenie alleli ojcowskich w bielmie zostało również potwierdzone przez Kinoshita i współautorów [22] w badaniach nad nasionami *Arabidopsis* po 4, 6, 7 i 8 dniach po zapyleniu. Wykorzystując ekotypy, u których allele *MEA* w zależności od płci były rozpoznawalne, analizowano ekspresję alleli obojga rodziców w krzyżówkach wstecznych przy wykorzystaniu RT-PCR. Autorzy wykryli ekspresję alleli ojcowskich genu *MEA* we wszystkich próbach i we wszystkich analizowanych stadiach rozwojowych nasion. W zarodkach po 6, 7 i 8 dniach po zapyleniu i w późniejszych stadiach rozwoju nasion wykryto obecność *MEA* mRNA obu rodziców. Natomiast w bielmie oraz w okrywie nasiennej po 6 i 7 dniach po zapyleniu stwierdzono jedynie ekspresję alleli pochodzących od matki. Z danych tych wyraźnie wynika, że jednorodzielskie wyciszenie imprintowanych genów występuje podczas rozwoju nasion ma miejsce jedynie w odniesieniu do bielma, a nie dotyczy zarodka.

To samo odnosi się do nowo odkrytych mutantów *capulet* (*cap1* i *cap2*) u *Arabidopsis*. Geny *CAP* wykazują typowy gametofitowy efekt matczyny i są niezbędne do inicjacji podziałów w zygocie i bielmie [13].

Wyciszenie genów ojcowskich

Badania nad specyficzną rodzicielską ekspresją 20 genów podczas embriogenezy i rozwoju nasion u *Arabidopsis thaliana* wykazały, że allele matczynie wielu, jeżeli nie wszystkich genów, są obecne po zapłodnieniu do stadium 32–64-komórkowego zarodka przy równoczesnym braku ekspresji odpowiednich alleli pochodzących od ojca [60,61]. Te wyniki świadczyły o tym, że ekspresja alleli ojcowskich jest opóźniona podczas rozwoju nasion, a wyciszenie występuje na poziomie transkrypcyjnym przez imprinting genomowy.

Postulowano nawet, biorąc pod uwagę, że testowano geny biorące udział w różnych procesach i rozmieszczone w różnych miejscach genomu, że podczas pierwszych 3 do 4 dni po zapłodnieniu u *Arabidopsis* większość genów, a być może nawet cały genom pochodzący od ojca ulega początkowemu wyciszeniu [11,31,61]. Można zatem przypuszczać, że po 3 bądź 4 dniach po zapłodnieniu bariery odpowiedzialne za hamowanie ekspresji genomu ojcowskiego zostają usunięte; nie dotyczy to jedynie genów podlegających imprintingowi ojcowskiemu w genomie bielma. Przyczyna opóźnionej transkrypcyjnej aktywacji genomu wnoszonego drogą ojcowską, jak również mechanizmy za nią odpowiedzialne nie zostały jeszcze wyjaśnione. Wiadomo jedynie, że nieaktywne geny *MEA* i *FIS2* wnoszone przez genom ojcowski nie ulegają aktywacji przez obniżenie poziomu metylacji DNA; regulacja ekspresji nie odbywa się przez zmiany wzoru metylacji. Stąd można wnioskować, że demetylacja musi aktywować inne, jeszcze niezidentyfikowane, geny pochodzenia ojcowskiego, które odgrywają rolę we wczesnym rozwoju nasion [30]. Oczywiście jest, że przy braku ekspresji genów ojcowskich, pierwsze podziały zygoty są programowane wyłącznie przez allele mateczne, chociaż ostatnio pojawiają się doniesienia o ekspresji alleli pochodzących od obu rodziców w przypadku genów wykazujących efekt matczyny. Na podstawie eksperymentów z zapłodnieniem *in vitro* wykryto wczesną, chociaż bardzo słabą, ekspresję genów ojcowskich w zarodkach *Arabidopsis thaliana* i w zygotach kukurydzy (zob. [47] i cyt. tam lit.). Podobnie, wykryto ekspresję genu *PROLIFERA* (*PRL*) pochodzącą od alleli obu rodziców w rozwijającym się zarodku i bielmie *Arabidopsis* [57]. Gen ten, kodujący białka regulujące replikację DNA w dzielących się komórkach, był uznany za preferencyjnie transkrybowany przez genom mateczny.

MECHANIZMY ODPOWIEDZIALNE ZA IMPRINTING U ROŚLIN

Hypometylacja

Ciągle niewiele jest badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za imprinting genomowy u roślin kwiatowych, chociaż istnieją już dane, że podobnie jak u ssaków, za imprinting genomowy odpowiedzialna jest metylacja DNA i kondensacja chromatyny. Wiadomo, że istnieje korelacja pomiędzy rodzicielsko-specyficzną metylacją DNA a stanem ekspresji większości imprintowanych genów [15]. Genom *Arabidopsis* zawiera homologi genów kodujących metylotransferazy DNA oraz metylowane białko wiążące grupę Polycomb (*methyl-CpG-binding protein*). Możliwość manipulowania mutacjami u *Arabidopsis* mającymi wpływ na metylację DNA i powiązane z nią zjawiska, np. wyciszanie transgenowe, ułatwia prześledzenie kolejnych etapów regulacji imprintingu genomowego.

Wpływ hypometylacji na reprodukcję badano u *Arabidopsis* wykorzystując antysensowny gen metyltransferazę (*Methyltransferase I – antisense gene – MET 1 a/s*), który redukuje metylację cytozyny w 85% [1]. W wyniku krzyżowania typu

hypometylowanego z dzikim, przy tym samym stopniu ploidalności, powstawały fenotypy o dużym podobieństwie do fenotypów uzyskanych w krzyżowaniach interploidalnych, których efektem było zakłócenie stosunku genomów rodzicielskich. Uzyskane wyniki mogą stanowić poparcie hipotezy o roli metylacji w ujawnianiu się efektu pochodzenia rodzicielskiego [1].

Na podstawie analizy fenotypów można przypuszczać, że hypometylacja w ziarnie pyłku “maternalizuje” genom ojcowski poprzez odwrócenie metylacji w naznaczonych imprintingiem allelach, które normalnie są wyciszone rodzicielsko; natomiast w załążku “paternalizacji” ulega komórka centralna. Danych na temat wpływu zmian w poziomie metylacji dostarczają badania nad mutantami o obniżonym poziomie metylacji w określonych genach. Na przykład żeński defekt gametofitowy w zmutowanych załążkach *mea*, *fis* i *fie* może być zniwelowany przez zapłodnienie pyłkiem pobranym z roślin o obniżonym poziomie metylacji DNA [15]. Zniesienie efektu mutacji jest możliwe dzięki aktywacji dzikiej ojcowskiej kopii genu, która ma zdemetylowany DNA. Jakkolwiek warto dodać, że odwrócenie mutacji ma miejsce niezależnie od tego, czy funkcjonuje zmutowany czy dziki gen *FIS*, pod warunkiem, że ziarna pyłku użyte do zapylenia mają zdemetylowany (hypometylowany) DNA [30]. Obniżenie metylacji męskiego gametofitu musi być pomostem koniecznym dla aktywacji *MEA* i *FIS2*, prawdopodobnie w obecności niezidentyfikowanych genów występujących w genomie męskim. Dla kontrastu odwrócenie mutacji *fie* jest możliwe tylko wówczas, gdy ziarno pyłku o obniżonej metylacji DNA niesie w sobie normalne, niezmutowane allele *FIE*. Inaczej więc niż *FIS2* i *MEA*, ekspresja genu *FIE* zachodzi we wczesnym etapie rozwoju zarówno zarodka, jak i bielma; brak ekspresji przy zapyleniu załążka *fie* pyłkiem o obniżonej metylacji, ale ze zmutowanym allem *fie*, może wskazywać na konieczność obecności dzikiego allelu *FIE* i jego aktywności w rozwijającym się zarodku [12].

Wszystkie trzy geny *FIS* są aktywne w komórce centralnej przed zapłodnieniem; konstrukt *FIS::GUS* dziedziczony ojcowsko nie ulegał ekspresji we wczesnym rozwoju bielma [61], z czego wynika, że genom męski nie jest aktywny aż do momentu osiągnięcia przez bielmo późniejszego stadium rozwojowego [28,61]. To wyjaśnia, dlaczego dziki gen *FIS* pochodzący od ziarna pyłku nie jest w stanie odwrócić matczynej mutacji *fis*, chociaż jest możliwe odwrócenie mutacji *fis1*, *fis2* i *fis3* zarówno poprzez obniżenie metylacji DNA (*DDM1*), jak i gen kodujący czynnik remodelujący chromatynę (*SWI2/SNF2-like chromatin remodeling factor*) [17,28], czy antysensowny konstrukt *MET1* [1,61].

Geny *MEA*, *FIS2* i *FIE* muszą być inaktywowane, aby przy braku zapylenia i zapłodnienia możliwy był rozwój bielma. W mutantach *mea* i *fis2* bielmo rozwijało się i ulegało celularyzacji, chociaż celularyzacja nie była obserwowana w przypadku mutacji *fie*. Wykazano natomiast, że u słabo zmetrylowanych mutantów *fiel* (*hypomethylated fiel mutants*) następował dalszy rozwój autonomicznego bielma. Dochodziło do zakładania ścian komórkowych i regionalnej specyfikacji bielma podobnie jak w nasionach typu dzikiego. Tak więc kombinacja niskozmetrylowanego genomu z utratą funkcji genów *FIE* umożliwiła powstanie i różnicowanie się bielma bez zapłodnienia [19,20,62–65].

Ostatnio, u *Arabidopsis*, sklonowano gen *MOM* (*Morpheus' Molecule*), który prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w wyciszaniu genów [3]. Mutacja tego genu prowadzi do reaktywacji transkrypcyjnie wyciszonych transgenicznych loci. Natomiast poziom metylacji tych loci nie ulega zmianie. Być może białka (*MOM*) są pośrednikiem między metylacją a aktualnym transkrypcyjnym wyciszeniem; nie można jednak wykluczyć, że *MOM* reguluje ekspresję genów inną, niezwiązaną z metylacją, drogą. Należałoby ustalić, do jakiego stopnia *MOM* reguluje ekspresję imprintowanych genów. Podobnie, nowo odkryty u *Arabidopsis* gen *DEMETER* (*DME*), wykazujący ekspresję w komórce centralnej, koduje białko z domeną glikozylazy DNA, które reguluje wczesne etapy rozwoju nasion przez aktywację matcznej kopii imprintowanego genu *MEDEA* [9].

Rola białek z grupy Polycomb w imprintingu genomowym

Geny *MEA* (*FIS1*) i *FIE* (*FIS3*) kodują białka homologiczne do występujących u *Drosophila* białek z grupy Polycomb (PcG), kodowanych odpowiednio przez geny *ENHANCER OF ZASTE E* (*Z*) i *EXTRA SEX COMBS* (*ESC*). Białka te regulują ekspresję genów przez epigenetyczne wyciszenie (*epigenetic silencing*); natomiast *FIS2* koduje czynnik transkrypcyjny (*zinc-finger transcription factor*) [14,36,40,-42,48,53,56].

Zróznicowane strukturalnie białka PcG tworzą przestrzenne (wielowymiarowe) kompleksy, które regulują ekspresję genów przez modulację struktur wyższego rzędu w chromatynie. Pomimo że białka PcG są znane przede wszystkim z regulacyjnej roli w kompleksie homeotycznym u zwierząt, wiele z tych genów kontroluje również proliferację komórek, co świadczy o ich funkcjonalnej konserwatywności u roślin i zwierząt [15]. Ostatnio wykryto u *Arabidopsis* gen *VRN2* związany z wernalizacją i wpływający na gen kwitnienia *Flowering Locus C* (*FLC*) [26]. Gen *VRN2* jest homologiczny do genu *FIS2*, należącego do kompleksu genów Polycomb, do którego należą również *MEDEA* (*MEA*) i *FIE*. Pomimo że białka *FIS2* nie wykazują bezpośredniej interakcji z białkami *MEA* i *FIE*, wszystkie działają razem w regulacji ekspresji genów. Interesujące byłoby zbadać, czy produkt genu *VRN2* jest obecny w kompleksie białkowym razem z białkami homologicznym do *MEA* i *FIE*.

Gen *FIS2* koduje białko o charakterze tzw. palców cynkowych (*Zn-finger protein*), co wskazuje na funkcję tego genu jako regulatora transkrypcji [29]. U *Drosophila* białko o takim samym charakterze, nazwane Hunchback (*HB*) jest włączane we wczesnych etapach powstawania kompleksu Polycomb [15]. Podobieństwo *MEA* i *FIE* do białek Polycomb oraz wspólne cechy fenotypowe mutantów *mea*, *fie* i *fis2* pozwalają przypuszczać, że białka *MEA* i *FIE* tworzą kompleks i zarządzają pracą genów docelowych odpowiedzialnych za proliferację komórek podczas rozwoju nasienia [54,66].

Dotychczas nie wyjaśniono, czy istnieje tylko kilka roślinnych białek, których obecność jest niezbędna w określonych tkankach i w określonym czasie, czy też rozległy zestaw białek Polycomb oddziałuje w różnych kombinacjach i reguluje rozwój rośliny przez cały czas.

Białka *E(Z)* i *ESC* wykazują ewolucyjną konserwatywność u bezkręgowców, kręgowców i roślin, a wiadomo, że u *Drosophila* białka te fizycznie współdziałają ze

sobą. Wykorzystanie dwuhybrydowego systemu drożdżowego pozwoliło zademonstrować bezpośrednio oddziaływanie pomiędzy MEA i FIE; nie wykazano natomiast żadnej interakcji pomiędzy MEA czy FIE a FIS2 przy zastosowaniu tego samego systemu [30,56]. Być może FIS2 działa tylko w bardzo wczesnych etapach formowania się kompleksu, podobnie jak białko HB u *Drosophila*, którego zadaniem jest "rekrutować" białka Polycomb do docelowych genów homeotycznych. Wzajemne oddziaływanie MEA i FIE zostało również potwierdzone w próbach *in vitro* [56].

Pomimo że znaczenie interakcji białek MEA-FIE nie zostało jeszcze wykazane *in planta* istnieje duże prawdopodobieństwo, że białka z grupy FIS (do których należą MEA i FIE), regulujące proliferację komórek w procesach reprodukcyjnych u *Arabidopsis*, tworzą wielobiałkowy kompleks podczas rozwoju nasienia. Oprócz wspólnego fenotypu, białka MEA i FIE występują w jądrze obok siebie i ulegają ekspresji w częściowo nakładających się na siebie domenach [56]. Podczas gdy MEA RNA ograniczony jest do żeńskiego gametofitu przed zapłodnieniem, FIE RNA w trakcie rozwoju ulega również ekspresji w tkankach sporofitowych; ekspresja pozostaje jednak ograniczona do żeńskiego gametofitu i otaczających go tkanek w stadium dojrzałości. Po zapłodnieniu, MEA i FIE RNA ulegają wspólnej ekspresji w zarodku właściwym i specyficznych regionach bielma. Analizy zachowania się połączonych z β -glukuronidazą białek MEA i FIE potwierdzają taki wzorzec ekspresji [30].

Podobieństwo białek MEA i FIE samo w sobie nie wyjaśnia efektu matczynego widocznego w fenotypach ze zmutowanym genem *fis*. Gametofitowy efekt matczyzny może być wywołany różnorodnymi mechanizmami:

(1) produkt genu może być deponowany w komórce jajowej lub komórce centralnej jako niezbędny czynnik dla prawidłowego rozwoju nasiona po zapłodnieniu,

(2) dany fenotyp może być efektem niepełnowartościowego stanu bielma spowodowanego brakiem haploidalnego genomu ojcowskiego,

(3) nie można wykluczyć również regulacji danego locus przez imprinting genomowy.

Badania nad naturą matczynego efektu u mutantów *fis* wyraźnie wykazały, że imprinting genomowy sprawuje kontrolę nad locus genowym *mea*. Imprintingowi genomowemu przypisuje się więc epigenetyczną regulację poprzez imprintowane geny, które z kolei wykazują zróżnicowaną ekspresję zależną od płci rodzica, od którego pochodzą [32].

IMPRINTING A REPRODUKCJA

Partenogeneza

Mechanizm regulacji epigenetycznej ma ogromne znaczenie w systemach hodowlanych, których celem jest doprowadzenie do rozmnażania bezpłciowego organizmów wyselekcjonowanych w wyniku długotrwałych zabiegów hodowlanych, jak również nieplodnych form pochodzenia mieszańcowego. Wiele gatunków zwierząt, włączając w to kręgowce (płazy, ryby, ptaki) ma potencjalne możliwości rozrodu drogą partenogenezy, ale nie notowano w naturze takiego sposobu rozmnażania u ssaków.

W warunkach eksperymentalnych partenogenetyczne zarodki ssaków bardzo szybko obumierają, co wydaje się być związane z istnieniem mechanizmu imprintingu genomowego, który wymagany jest zarówno w genomie matczynym, jak i ojcowskim; staje się on przeszkodą w przypadku naturalnego klonowania.

Całkiem odmienna sytuacja jest u roślin. Wśród *Angiospermae* ponad 300 taksonów należących do ok. 40 rodzin rozmnaża się w drodze apomiksji. 75% gatunków apomiktycznych należy do 3 rodzin: *Asteraceae*, *Poaceae* i *Rosaceae* (zob. [27] i cyt. tam lit.). W tym modelu rozmnażania, nasiona powstają z ominięciem procesu zapłodnienia komórki jajowej i komórki centralnej (apomikty autonomiczne) bądź jedynie komórki jajowej, przy wystąpieniu zapłodnienia komórki centralnej (apomikty pseudogamiczne). W obu typach powstały zarodek ma wyłącznie genomy matczyne (2 lub więcej w zależności od stopnia ploidalności organizmu; jest to wynik ominięcia mejozy w przypadku apomiksji sporofitowej bądź zakłóceń tego podziału u apomiktów gametofitowych). Do apomiktów autonomicznych należy ok. 70 gatunków z rodziny *Asteraceae*, co wskazuje, że jednak u większości taksonów rozmnażających się apomiktycznie zapłodnienie komórki centralnej jest niezbędne do powstania bielma. Haig i Westoby [18] uważają, że apomiksja mogła ewoluować niezależnie w różnych taksonach *Angiospermae*, ponieważ zarodek jest stosunkowo mało wrażliwy na imprinting, co w konsekwencji umożliwia jego rozwój bez udziału genomu męskiego pod warunkiem, że występuje bielmo powstałe w wyniku zapłodnienia komórki centralnej. Z tego powodu epipleć również u roślin pozostaje często barierą w samopowielaniu się osobników.

Jednym z głównych celów, jaki stawiają sobie od wielu lat hodowcy roślin, jest uzyskanie roślin uprawnych rozmnażających się w drodze apomiksji [7,24,25,39,55]. Pomimo niezliczonych badań nad wprowadzeniem genów apomiksji do roślin uprawnych, takich jak: kukurydza czy ryż, wspieranych finansowo ze środków publicznych i prywatnych, jak również przez międzynarodowe instytucje (np. CIMMYT), nie udało się do tej pory uzyskać komercyjnych apomiktycznych odmian kukurydzy. Należy również wspomnieć, że ostatnio sfinansowano ponad 20 patentów dotyczących apomiksji (dane te można znaleźć na stronach internetowych pod hasłem Apomixis). Przyczyną niepowodzeń w wyprodukowaniu nowych apomiktycznych odmian roślin uprawnych jest ciągle brak znajomości genetycznych mechanizmów tego procesu. Szereg czynników należy dokładnie przebadać np. fakultatywność procesu, liczbę odpowiedzialnych genów, wpływ czynników środowiskowych i poziomu ploidalności, sterylność nasion. Podstawowym problemem w planowanych programach hodowlanych jest wrażliwość bielma na epipleć. Bielmo, jako tkanka odżywcza, jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu embriogenezy i/lub kiełkowania nasienia.

Badania nad mutantami u *Arabidopsis* otwierają być może perspektywy możliwości manipulacji genetycznych, w wyniku których uda się doprowadzić do przełączenia z płciowego na apomiktyczny sposób rozmnażania. U rozmnażającego się płciowo gatunku, jakim jest *Arabidopsis thaliana*, zmutowane allele genów *FIS* powodują proliferację komórki centralnej bez zapłodnienia. Sama mutacja nie jest wystarczająca do rozwoju bielma wg wzoru charakterystycznego dla typu dzikiego (po zapłodnieniu).

Bielmo powstałe u mutantów nie było zróżnicowane na regiony (na przykład nie wyodrębniał się region chlazalny). Natomiast obniżenie poziomu metylacji u mutantów *fiel* przez antysensowny gen *MET1* spowodowało kontynuację rozwoju autonomicznego bielma. Jak można interpretować powyższe wyniki? Do normalnego rozwoju bielma potrzebna jest obecność genomu ojcowskiego; w zmutowanych załączkach *fiel* rozwój autonomicznego bielma odbywał się bez udziału genomu ojcowskiego, co prawdopodobnie uniemożliwiało prawidłowy jego rozwój. W nasionach powstających w drodze płciowej hypometylacja epigenotypu matczynego następuje po dodaniu epigenotypu „p” pochodzącego od ojca [1], z czego można wnioskować, że obniżenie metylacji u mutantów *fiel* można uznać za substytucję brakującego genomu ojcowskiego.

Prezentowane powyżej wyniki sugerują, że w nasionach powstających drogą płciową mutacja *fis* sama w sobie wywołuje paternalizację (maskulinizację). Być może, kompleks białkowy FIS i metylacja DNA współdziałając razem wstrzymują ekspresję ojcowsko-specyficznych genów w genomie matczynym, co wyjaśniałoby dodatkowy efekt mutacji *fiel* i hypometylacji. Tego rodzaju interakcja pomiędzy białkami Polycomb i innymi regulatorami epigenetycznymi została potwierdzona w eksperymentach nad homologami białek FIS1/MEA i FIS3/FIE u *Drosophila* związanymi ściśle z deacetylazą histonów [17,54,58].

Mutacja *fie* ujawniła, że *Arabidopsis*, roślina rozmnażająca się płciowo, ma genetyczną zdolność do rozmnażania się i rozwoju niezależnie od zapłodnienia. Nie wiadomo, czy mechanizm niezależnego od zapłodnienia rozwoju bielma związanego z mutacją *fie* jest taki sam jak obserwowany podczas powstawania autonomicznego bielma u niektórych apomiktycznych gatunków. Fakt, że fenotyp *fie* jest wynikiem pojedynczej mutacji w genetycznym locus, może dowodzić, że różnice pomiędzy płciowym a bezpłciowym rozmnażaniem u roślin są niewielkie [24,25].

Niezgodność międzygatunkowa

Badania nad przedstawicielami wielu rodzajów *Angiospermae* ilustrują wpływ epipłci na zdolność do krzyżowania. Niektóre gatunki o tym samym stopniu ploidalności podczas krzyżowania zachowywały się jak gatunki z odmiennymi stopniami ploidalności, co prawdopodobnie jest skutkiem zakłóceń w równowadze genomów [18]. Johnston i współautorzy [21] tłumaczą to zjawisko hipotezą EBN (*Endosperm Balance Number*). W systemie tym sukces czy niepowodzenie krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych są zależne od tzw. “efektywnej ploidalności” (*effective ploidy*); w bielmie musi być zachowany stosunek 2:1 genomów matczynego i ojcowskiego.

Gatunkowy EBN odzwierciedla z jednej strony efektywność, z jaką genom pochodzący od ojca może przekazać zasoby potomstwu, z drugiej zaś, z jaką genom pochodzący od matki może hamować transfer tych zasobów [18,54]. Genom ojcowski u gatunków z wysokim EBN może wyciszać więcej inhibitorów wzrostu bielma niż u gatunków z niskim EBN lub może tłumić te inhibitory przez dłuższy czas. Manipulacje stosunkami EBN w bielmie przez zmiany ploidalności jąder biegunowych czy jąder plemnikowych pozwalają normalnie niezgodnym gatunkom zawiązać nasiona. Modyfikacja epipłci w gametach jednego z organizmów rodzicielskich powinna także umożliwić krzyżowanie gatunków z odmiennymi EBNs [16].

PODSUMOWANIE

Przekształcenie się zalążka w dojrzałe nasiono u roślin kwiatowych jest procesem skomplikowanym i wymaga skoordynowanej ekspresji wielu genów w stosunkowo krótkim czasie. Odkrycie, zidentyfikowanie i ustalenie roli poszczególnych genów zaangażowanych w rozwój nasion będzie procesem długotrwałym i wymagającym współpracy genetyków, embriologów, biologów molekularnych i naukowców zajmujących się biologią komórki. Niemniej jednak, badania molekularne i genetyczne ostatnich kilku lat nad *Arabidopsis thaliana* pozwoliły na odkrycie nowych zjawisk, bądź potwierdziły hipotezy stawiane na podstawie badań genetycznych. Do takich nowych idei należy odkrycie imprintingu genomowego u roślin kwiatowych ujawniającego się w trakcie podwójnego zapłodnienia, jak również stwierdzenie, że pierwsze podziały jądra zygoty i komórki centralnej pozostają pod wyłączną kontrolą alleli matczynych. Epigenetyczne zjawiska towarzyszą wczesnemu rozwojowi zarodka i nasion. Stąd też badania nad imprintingiem genomowym mogą rzucić nowe światło na genetyczne mechanizmy kontrolujące rozwój nasion. Funkcje wielu genów zidentyfikowanych w całkowicie zsekwencjonowanym genomie *Arabidopsis* nie są znane, ale można je ustalić na podstawie homologii z dobrze zdefiniowanymi genami innych organizmów. W ten sposób wykazano, że każdy z 3 genów *FIS* u *Arabidopsis*, hamujących rozwój bielma przed zapłodnieniem, wykazuje dużą homologię z klasą genów PcG u *Drosophila*. Białka PcG są odpowiedzialne za represję aktywności genów przez zmiany w strukturze chromatyny.

Niezwykle ważnym zagadnieniem praktycznym jest możliwość zaindukowania apomiksji u płciowo rozmnażających się roślin uprawnych. Pozwoliłoby to na powielanie genotypów uzyskanych w trakcie długotrwałych zabiegów hodowlanych. Możliwość manipulacji ekspresją genów otwiera nowe możliwości w dziedzinie indukcji apomiksji.

LITERATURA

- [1] ADAMS S, VINKENOOG R, SPIELMAN M, DICKINSON HG, SCOTT RJ. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* 2000; **127**: 2493–2502.
- [2] ALLEMAN M, DOCTOR J. Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 147–161.
- [3] AMEDEO P, HABU Y, AFSAR K, MITTELSTEN SCEID O, PASZKOWSKI J. Disruption of the plant gene *MOM* releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* 2000; **405**: 203–206.
- [4] ARNEY KL, ERHARDT S, DREWELL RA, SURANI MA. Epigenetic reprogramming of the genome – from the germ line to the embryo and back again. *Int J Dev Biol* 2001; **45**: 533–540.
- [5] CHARLTON WL, KEEN CL, MERRIMAN C, LYNCH P, GREENLAND AJ, DICKINSON HG. Endosperm development in *Zea mays*; implication of gametic imprinting and paternal excess in regulation of transfer layer development. *Development* 1995; **121**: 3089–3097.
- [6] CHAUDHURY AM, MING L, MILLER C, CRAIG S, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Fertilization independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4223–4228.
- [7] CHAUDHURY AM, CRAIG S, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 26–31.

- [8] CHAUDHURY AM, KOLTUNOW A, PAYNE T, LUO M, TUCKER MR, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Control of early seed development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 677–699.
- [9] CHOI Y, GEHRING M, JOHNSTON I, HANNON M, HARADA JJ, GOLDBERG RB, JACOBSEN SE, FISCHER RL. *DEMETE*R, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell* 2002; **110**: 33–42.
- [10] COLOMBO L, FRANKEN J, VAN DER KROL AR, WITTICH PE, ONOS HJM, ANGENENT GC. Downregulation of ovule-specific MADS box genes from *Petunia* results in maternally controlled defects in seed development. *Plant Cell* 1997; **9**: 703–715.
- [11] FINNEGAN EJ. Is plant gene expression regulated globally? *Trends in Genet* 2001; **17**: 361–365.
- [12] FINNEGAN EJ, PEACOCK WJ, DENNIS ES. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev* 2000; **10**: 217–223.
- [13] GRINI PE, JÜRGENS G, HULSKAMP M. Embryo and endosperm development is disrupted in the female gametophytic *capulet* mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 2002; **62**: 1911–1925.
- [14] GROSSNIKLAUS U, VIELLE-CALZADA JP, HOEPNER MA, AGLIANO WB. Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* group gene in *Arabidopsis*. *Science* 1998; **280**: 446–450.
- [15] GROSSNIKLAUS U, SPILLANE C, PAGE DR, KÖHLER C. Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 21–27.
- [16] GUTIERREZ-MARCOS JF, PENNINGTON PD, COSTA LM, DICKINSON HG. Imprinting in the endosperm: a possible role in preventing wide hybridization. *Philos Trans Roy Soc B* 2003; **358**: 1105–1111.
- [17] HABU Y, KAKUTANI T, PASZKOWSKI J. Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2001; **11**: 215–220.
- [18] HAIG D, WESTOBY M. Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implication for the evolution of apomixis. *Philos Trans Roy Soc London Ser B* 1991; **333**: 1–13.
- [19] JEDDELOH JA, BENDER J, RICHARDS EJ. The DNA methylation locus *DDM1* is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 1998; **12**: 1714–1725.
- [20] JEDDELOH JA, STOKES TL, RICHARDS EJ. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* 1999; **22**: 94–97.
- [21] JOHNSTON SA, HANNEMAN RE, Jr. The nature of the genetic control of endosperm balance number based on aneuploid analysis of *Datura*. *Sex Plant Reprod* 1999; **12**: 71–75.
- [22] KINOSHITA T, YADEGERI R, HARADA JJ, GOLDBERG RB, FISCHER RL. Imprinting of the *MEDEA Polycomb* gene in the *Arabidopsis* endosperm. *Plant Cell* 1999; **11**: 1945–1952.
- [23] KIYOSUE T, OHAD N, YADEGARI R, HANNON M, DINNENY J, WELLS D, KATZ A, MAGROSSIAN L, HARADA JJ, GOLDBERG RB, FISCHER RL. Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA Polycomb* gene in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4186–4191.
- [24] KOLTUNOW AM, BICKNELL RA, CHAUDHURY AM. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without pollination. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1345–1352.
- [25] KOLTUNOW AM, GROSSNIKLAUS U. Apomixis: A developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 547–574.
- [26] KÖHLER C, GROSSNIKLAUS U. Epigenetics: the flowers that come dispatch in from the cold. *Curr Biol* 2002; **12**: 129–131.
- [27] KUTA E, ROJEK J. Bielmo – tkanka odżywiająca zarodek II. Autonomiczny rozwój bielma u roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*). *Kosmos* 2002; **51**: 85–97.
- [28] LOHE AR, CHAUDHURY A. Genetic and epigenetic processes in seed development. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 19–25.
- [29] LUO M, BILODEAU P, KOLTUNOW A, DENNIS ES, PEACOCK WJ, CHAUDHURY AM. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 296–301.
- [30] LUO M, BILODEAU P, DENNIS ES, PEACOCK WJ, CHAUDHURY AM. Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEDEA* and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10637–10642.
- [31] MA H. Gene regulation: Better late than never? *Curr Biol* 2000; **10**: 365–368.
- [32] MESSING J, GROSSNIKLAUS U. Genomic imprinting in plants. *Results Probl Cell Differ* 1999; **25**: 23–40.
- [33] MORA-GARCIA S, GOODRICH J. Genomic imprinting: Seeds of conflict. *Curr Biol* 2000; **10**: 71–74.
- [34] MUSIAŁ K, PRZYWARA L. Gynogeneza u roślin. *Kosmos* 2001; **50**: 39–48.

- [35] OHAD N, MAGROSSIAN L, HSU YC, WILLIAMS CH, REPETTI P, FISCHER RL. A mutation that allows endosperm development without fertilisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5319–5324.
- [36] OHAD N, YADEGARI R, MAGROSSIAN L, HANNON M, MICHAELI D, HARADA JJ, GOLDBERG RB, FISCHER RL. Mutations in *FIE* a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* 1999; **11**: 407–415.
- [37] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T. Metylacja DNA u roślin. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 253–262.
- [38] OLSZEWSKA MJ. Zmiany metylacji cytozyny podczas różnicowania komórek u roślin. *Post Biol Kom* 1999; **26** supl 13: 83–93.
- [39] PEACOCK WJ, MING L, CRAIG S, DENNIS E, CHAUDHURY A. A mutagenesis programme for apomixis genes in *Arabidopsis*. W: *Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement*. Wiena, Austria: FAO/IAEA 1995: 117–125.
- [40] PIRROTTA V. Polycomb silencing and the maintenance of stable chromatin states. *Results Probl Cell Differ* 1999; **25**: 205–228.
- [41] POPIELARSKA M, PRZYWARA L. Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*): I. Zapłodnienie *in vitro* z użyciem izolowanych gamet. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 795–809.
- [42] PREUSS D. Chromatin silencing and *Arabidopsis* development: a role for Polycomb proteins. *Plant Cell* 1999; **11**: 765–768.
- [43] PRZYWARA L, POPIELARSKA M. Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*): II. Biochemiczne i molekularne aspekty zapłodnienia. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 811–827.
- [44] RAGHAVAN V. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge University Press, 1997.
- [45] RAGHAVAN V. Embryogenesis at the crossroads – some perspectives on over a century of plant embryo research. *Acta Biol Cracov Bot* 2000; **42/2**: 31–38.
- [46] RAGHAVAN V. The coming age of plant embryology. *Curr Sci* 2001; **80**: 244–251.
- [47] RAGHAVAN V. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytol* 2003; **159**: 565–583.
- [48] REYES JC, GROSSNIKLAUS U. Diverse functions of Polycomb group proteins during plant development. *Sem Cell Devel Biol* 2003; **14**: 77–84.
- [49] ROJEK J, KUTA E. Bielmo – tkanka odżywiająca zarodek I. Bielmo u roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*) jako wynik podwójnego zapłodnienia. *Kosmos* 2002; **51**: 69–83.
- [50] SCHAUER SE, JACOBSEN SE, MEINKE DW, RAY A. *DICER-LIKE1*: blind man and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 487–491.
- [51] SCHUBERT D, GOODRICH J. Plant epigenetics: MEDEA's children take centre stage. *Curr Biol* 2003; **13**: 638–640.
- [52] SCOTT RJ, SPIELMAN M, BAILEY J, DICKINSON HG. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1998; **125**: 3329–3341.
- [53] SRØRENSEN MB, CHAUDHURY AM, ROBERT H, BANCHAREL E, BERGER F. Polycomb group genes control pattern formation in plant seed. *Curr Biol* 2001; **11**: 277–281.
- [54] SPIELMAN M, VINKENOOG R, DICKINSON HG, SCOTT RJ. The epigenetic basis of gender in flowering plants and mammals. *Trends Genet* 2001; **17**: 705–711.
- [55] SPIELMAN M, VINKENOOG R, SCOTT RJ. Genetic mechanisms of apomixis. *Philos Trans Roy Soc B* 2003; **3358**: 1095–1103.
- [56] SPILLANE C, MACDOUGALL C, STOCK C, KÖHLER C, VIELLE-CALZADA JP, NUNES MS, GROSSNIKLAUS U, GOODRICH J. Interaction of the *Arabidopsis* Polycomb group proteins FIE and MEA mediates their common phenotypes. *Curr Biol* 2000; **10**: 1535–1538.
- [57] SPRINGER PS, HOLDING DR, GROOVER A, YORDAN C, MARTIENSSSEN RA. The essential Mcm7 protein PROLIFERA is localized to the nucleus of dividing cells during G1 phase and is required maternally for early *Arabidopsis* development. *Development* 2000; **127**: 1815–1822.
- [58] TIAN L, CHEN ZJ. Block in histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 200–205.
- [59] TILGHMAN SM. The sins of the fathers mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 1999; **96**: 185–193.
- [60] VIELLE-CALZADA JP, THOMAS J, SPILLANE C, COLUCCIO A, HOEPPNER MA, GROSSNIKLAUS U. Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis medea* locus requires zygotic *DDMI* activity. *Genes Dev* 1999; **13**: 2971–2982.
- [61] VIELLE-CALZADA JP, BASKAR R, GROSSNIKLAUS U. Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 2000; **404**: 91–94.

- [62] VINKENOOG R, SPIELMAN M, ADAMS S, FISCHER RL, DICKINSON HG, SCOTT RJ. Hypomethylation promotes autonomous endosperm development and rescues postfertilization lethality in *fie* mutants. *Plant Cell* 2000; **12**: 2271–2282.
- [63] VINKENOOG RL, SCOTT RJ. Autonomous endosperm development in flowering plants: how to overcome the imprinting problem? *Sex Plant Reprod* 2001; **14**: 189–194.
- [64] VINKENOOG R, SPIELMAN M, ADAMS S, DICKINSON HG, SCOTT RJ. Genomic imprinting in plants. W: Ward A [red.] *Methods in Molecular Biology* tom **181**: Genomic Imprinting: Methods and Protocols. Humana Press. Inc., Totowa, NJ 2001: 327–370.
- [65] VINKENOOG R, BUSHELL C, SPIELMAN M, ADAMS S, DICKINSON HG, SCOTT RJ. Genomic imprinting and endosperm development in flowering in plants. *Mol Biotech* 2003; **25**: 149–184.
- [66] YADEGARI R, KINOSHITA T, LOTAN O, COHEN G, KATZ A, CHOI Y, NAKASHIMA K, HARADA JJ, GOLDBERG RB, FISCHER RL, OHAD N. Mutation in the *FIE* and *MEA* genes that encode interacting Polycomb proteins cause parent-of-origin effects on seed development by distinct mechanisms. *Plant Cell* 2000; **12**: 2367–2381.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 23.01.2004R.

Przyjęto: 09.03. 2004 R.

e-mail: e.kuta@iphils.uj.edu.pl

Main body of text, consisting of several paragraphs of faint, illegible text.

Author's name
Institution

OLIGO- I MONOMERYCZNE LIGAZY UBIKWITYNOWE E3 Z DOMENĄ *RING FINGER* – BUDOWA I DZIAŁANIE

OLIGO- AND MONOMERIC UBIQUITIN LIGASES E3
WITH *RING FINGER* DOMAIN – STRUCTURE AND FUNCTION

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
PAN, Warszawa

Streszczenie: W artykule podano podstawowe informacje na temat proteolizy zachodzącej z udziałem układu ubikwityna/proteasom 26S, ściśle regulowanego procesu niezbędnego dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Skoncentrowano się na omówieniu białek zawierających domenę *RING finger* i funkcjonujących jako ligazy ubikwitynowe E3, dołączające ubikwitynę do białek przeznaczonych do degradacji w proteasomie. Podkreślono niezbędność domeny *RING finger* w działaniu ligaz ubikwitynowych oligo- (SCF, Parkina, VCB, APC/C) i monomerycznych (c-Cbl, MDM2, BRCA1, CHFR, IAP). Zwrócono uwagę, że zaburzenia ekspresji i działania ligaz ubikwitynowych mogą leżeć u podstaw różnych schorzeń.

Słowa kluczowe: proteoliza, ubikwityna, proteasom 26S, ligazy ubikwitynowe E3, domena *RING finger*

Summary: In the article the basic information is given about proteolysis carried out with participation of ubiquitin/proteasome 26S system, the highly regulated process indispensable for cell functioning. The main subject of the article is the description of proteins containing the *RING finger* domain and functioning as ubiquitin ligases E3 involved in the ubiquitination of proteins destined to the degradation in the proteasome. The importance of *RING finger* domain in functioning of oligomeric (SCF, Parkin, VCB, APC/C) as well as monomeric (c-Cbl, MDM2, BRCA1, CHFR, IAP) ubiquitin ligases was stressed. Moreover it was pointed out, that the abnormalities of expressions and functioning of the ubiquitin ligases may be connected with various diseases.

Key words: proteolysis, ubiquitin, proteasome 26S, ubiquitin ligases E3, *RING finger* domain

1. WSTĘP

Proteolityczna degradacja białek komórkowych jest, jak się powszechnie uznaje, wysoce złożonym, ściśle regulowanym procesem, w którym uczestniczy wiele różnych enzymów proteolitycznych. Szczególną rolę w komórkach przypisuje się złożonemu

układowi ubikwityna/proteasom 26S, odpowiedzialnemu za degradację nie tylko uszkodzonych i nieprawidłowych białek, ale i bardzo licznych białek regulatorowych. Proteasom 26S jest dużym, wieloskładnikowym kompleksem białkowym charakteryzującym się szerokim spektrum aktywności proteolitycznej. Zbudowany jest z 2 podstawowych subkompleksów: rdzenia 20S o aktywności katalitycznej oraz dwóch podjednostek regulatorowych 19S [122, 142].

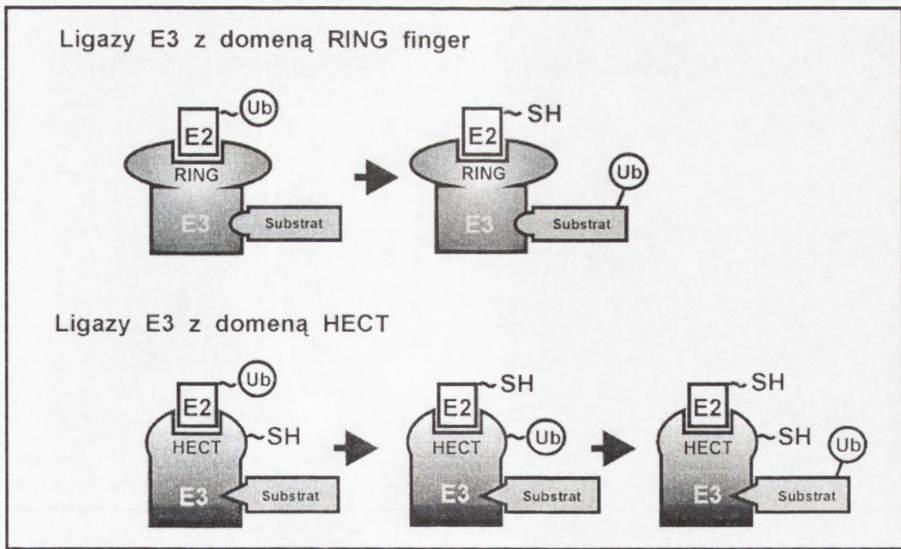
Białka przeznaczone do degradacji w proteasomie 26S muszą przed tym zostać oznakowane ubikwityną, małym, 76-aminokwasowym, globularnym białkiem opisanym po raz pierwszy w 1975 roku. W kaskadowym, zachodzącym przy udziale ATP procesie ubikwitynacji, polegającym na sekwencyjnym działaniu co najmniej 3 enzymów ($E1 \rightarrow E2 \rightarrow E3$), cząsteczki ubikwityny zostają dołączone do białkowego substratu, następnie zaś kompleks ten zostaje skierowany do proteasomu 26S. Przed dostaniem się do jego wnętrza, ale już po rozpoznaniu przez podjednostkę regulatorową 19S proteasomu, enzymy deubikwitynujące, w tym metaloproteaza Rpn1, odszczepiają łańcuch poliubikwitynowy od białkowego substratu, dzięki czemu staje się możliwe rozfałdowanie białka i strawienie go w proteasomie [40, 120, 132]. Zagadnienia te od blisko 20 lat stanowią przedmiot intensywnych badań i są omawiane w publikowanych niemal corocznie artykułach przeglądowych [np. 11, 36, 43, 91].

Etapem szczególnie istotnym w prawidłowym przebiegu kontrolowanej proteolizy jest prawidłowe oznakowanie białka mającego ulec degradacji. Oznakowania ubikwityną dokonują różne ligazy ubikwitynowe, których funkcją jest rozpoznanie substratu i dołączenie do niego cząsteczki ubikwityny lub łańcucha poliubikwitynowego. Ligazy ubikwitynowe mogą być złożone z kilku lub kilkunastu podjednostek lub stanowić tylko pojedyncze polipeptydy. Wyróżnia się obecnie dwie podstawowe klasy tych enzymów – ligazy z domeną *RING finger* (RF), katalizujące bezpośrednie przeniesienie zaktywowanej i powiązanej z E2 ubikwityny na białkowy substrat oraz ligazy z domeną *HECT* (*Homologous to the E6-AP C-terminus*), w których przed ostatecznym dołączeniem ubikwityny do właściwego substratu ma miejsce przeniesienie zaktywowanej ubikwityny z enzymu E2 na ligazę ubikwitynową (enzym E3) z utworzeniem wysokoenergetycznego wiązania E3-S~Ub (ryc.1). Ostatnio dyskutowany jest też problem, czy przynajmniej część białek z domeną *PHD finger* (*Plant Homeodomain*), które podobnie jak białka z domeną RF wiążą jony cynku, można traktować jako odrębną klasę ligaz ubikwitynowych. Jak dotąd, nie uzyskano jednak konsensusu w tej sprawie [15, 102]. Sugeruje się także, że białka z domeną *U-box* traktowaną jako modyfikacja domeny RF [1], działają również jako ligazy ubikwitynowe [45].

W artykule skoncentruję się na omówieniu ligaz ubikwitynowych, które charakteryzują się obecnością domeny RF i są bądź kompleksami złożonymi z kilku lub kilkunastu podjednostek bądź pojedynczymi polipeptydami.

1.1. Budowa domeny RF i jej występowanie w ligazach ubikwitynowych

Domena RF to linearna sekwencja wielu reszt cysteinowych i histydynowych, kodowanych przez gen *RING1* (*Really Interesting New Gene 1*), w ludzkim genomie umiejscowiony na chromosomie 6. Domena ta lub jej warianty, uczestniczą w wiązaniu

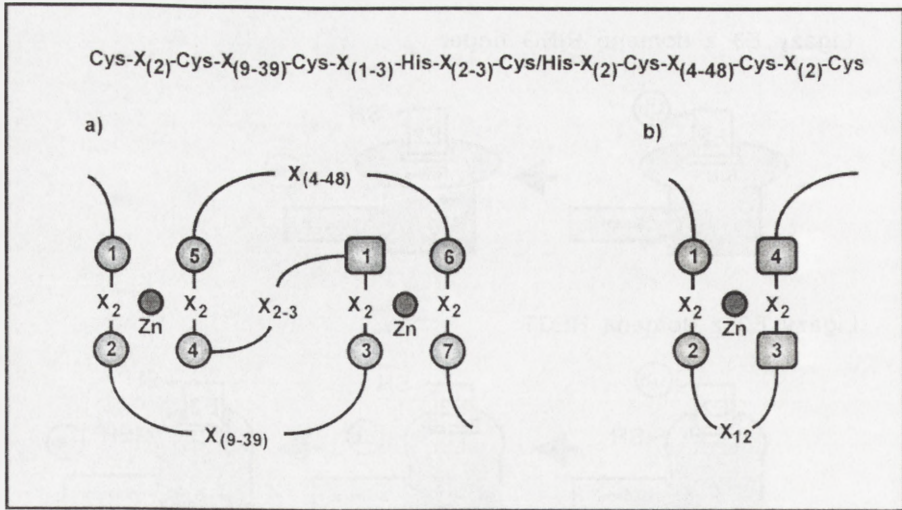


RYCINA 1. Schemat działania ligaz ubikwitynowych z domenami *RING finger* i HECT

jonów cynku (2 atomy cynku na cząsteczkę białka z domeną RF). Na rycinie 2 przedstawiono schematycznie budowę domeny RF występującą w ligazach ubikwitynowych oraz „klasyczną” sekwencję aminokwasową w czynniku transkrypcyjnym TFIIIA wiążącą jony cynku [98]. Związanie jonów cynku jest niezbędne do odpowiedniego sfaldowania łańcucha polipeptydowego i przyjęcia przez cząsteczkę białka odpowiedniej konformacji przestrzennej [5].

W obrębie coraz to powiększającej się rodziny białek z domeną RF wyróżnia się też białka z domeną *RING-H2*, w których zamiast cysteiny w pozycji 5 występuje histydyna oraz grupę białek, w których np. cysteinę w określonych pozycjach zastępuje treonina czy też asparagina [5]. Białka z domeną RF lub jej wariantami znaleziono, jak dotąd, w ponad 200 białkach cytoplazmatycznych i jądrowych. Pełnią one w komórkach eukariotycznych bardzo różne funkcje, między innymi uczestniczą w różnych szlakach przekazywania sygnałów prowadzących do proliferacji, różnicowania bądź apoptozy [5, 14, 19, 98]. Domena RF może też w połączeniu z innymi domenami tworzyć większe konserwowane motywy, np. RBCC (*RING finger-B box- α -helical Coiled-Coil*). Dokładniejsze omówienie tych zagadnień znaleźć można w artykułach przeglądowych Borden i Saurin [5, 98].

Już od połowy lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku wiadomo, że domena RF może brać bezpośredni udział w oddziaływaniach między jednakowymi lub różnymi białkami, a także prawdopodobnie z DNA, warunkujących powstałym kompleksom pełnienie określonych funkcji [5, 98]. Począwszy od 1999 roku ukazują się wręcz lawinowo prace dokumentujące, że białka z domeną RF zaangażowane są także w ubikwitynację białek [60]. Biorą bowiem udział w rekrutacji do ligaz ubikwitynowanych enzymów E2 przenoszących zaktywowaną ubikwitynę na białkowy substrat i być może



RYCINA 2. Sekwencje aminokwasowe i schemat struktury *RING finger* oraz *Zn finger* w czynniku transkrypcyjnym TFIIIA (wg [2 i 8] zmodyf.), kółkami oznaczono reszty cysteinowe, kwadratami reszty histydynowe

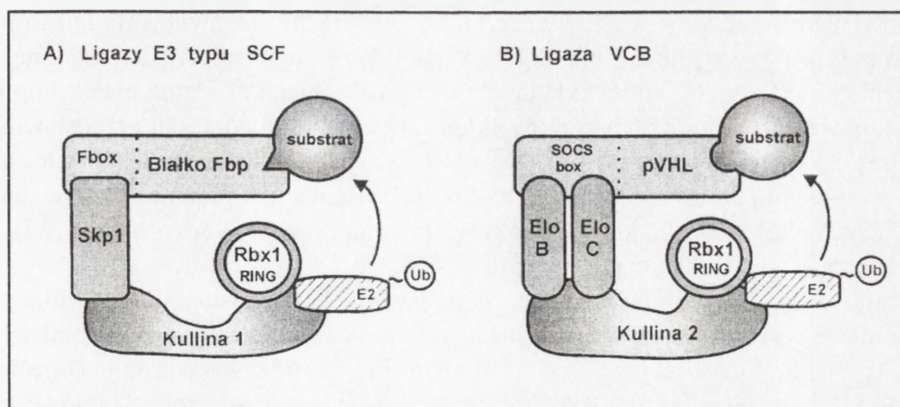
w ich allosterycznej aktywacji [28], a tym samym uczestniczą w syntezie łańcucha poliubikwitynowego [np. 74, 134].

W ligazach ubikwitynowych złożonych z kilku lub kilkunastu podjednostek domenę RF znaleziono w podjednostce ROC1/Rbx1/Hrt1 (ligazy SCF i ligaza VCB [61, 84, 107]) oraz białku Apc11 (ligaza APC/C [32,67]). Sugeruje się, że w oligomerycznych ligazach powiązanie białka ROC1 (*Regulator of Cullin1*) z kulliną ochrania je przed degradacją w proteasomie [85]. W ligazach ubikwitynowych będących pojedynczymi peptydami domena RF występuje na ogół w środkowej lub C-końcowej części cząsteczki, jak np. w białku Cbl i MDM2, wyjątek stanowi białko BRCA1, w którym RF znajduje się w N-końcu (patrz ryc. 5). W dalszej części artykułu omówię działanie tych ligaz, a także zasygnalizuję ich udział w ubikwitynacji różnych białek i tym samym w regulacji bardzo różnych procesów biologicznych.

2. OLIGOMERYCZNE LIGAZY UBIKWITYNOWE E3

2.1 Ligazy RF typu SCF

Podjednostkami ligaz RF typu SCF (*Skp1-Cullin-F-box-ROC1*) są co najmniej 4 białka – kullina, białko z motywem *F-box*, białko Skp1 oraz wspomniane powyżej białko ROC1/Rbx1/Hrt1. Nie można też wykluczyć, że i inne, niezidentyfikowane jeszcze białka, mogą wchodzić w skład tego kompleksu. W 2002 przedstawiono strukturę kompleksu SCF uczestniczącego w degradacji inhibitora kinaz cyklicznych [140]. Schematyczną budowę kompleksu pokazano na rycinie 3. Najwcześniej i stosunkowo



RYCINA 3. Schemat budowy ligazy typu SCF i VCB (wg [60 i 91], zmodyfikowane)

najlepiej poznane są ligazy typu SCF zawierające kullinę 1, obecnie znane są także ligazy, w skład których wchodzi i inne kulliny.

Kullina 1 należy do rodziny kullin (Cul 1-7 oraz APC 2) tworzących pomost, na którym dochodzi do współdziałania z innymi podjednostkami kompleksu. Charakteryzuje się budową domenową; C-końcowa, 360-aminokwasowa domena globularna wiąże białko ROC1/Rbx1 (z domeną RF), natomiast z N-końcowym, zbudowanym z 415 aminokwasów, pałeczkowatym fragmentem kulliny, przyjmującym „stalk-like structure”, wiąże się białko Skp1 [140] stanowiące łącznik pomiędzy kulliną a białkiem Fbp.

Dane na temat regulacji ekspresji kullin są, jak dotąd, nieliczne. Wiadomo na przykład że protoonkogen c-Myc stymuluje ekspresję kulliny 1 [83], czy też że gen kodujący kullinę 4A ulega amplifikacji w nowotworach wątroby [133]. Znacznie lepiej poznane są modyfikacje potranslacyjne tych białek, z których najważniejszą wydaje się być neddylacja. Polega ona na dołączeniu do kulliny będącej w kompleksie z białkiem ROC1, pokrewnego ubikwitynie białka Nedd8/Rub1 [51, 63, 125]. Modyfikacja ta aktywuje ligazę, promując poliubikwitynację substratu, ułatwiając dołączenie pierwszej cząsteczki ubikwityny być może poprzez kontakt z enzymem E2 [125]. Do 2002 roku precyzyjny mechanizm tej aktywacji pozostawał nieznan. W 2002 roku wykazano, że neddylacja powoduje oddysocjowanie od kompleksu kullina-ROC1 białka CAND1 (*Cullin-Associated and Neddylation-Dissociated*), hamującego interakcję kulliny z białkiem Skp 1, a tym samym aktywność ligazy [73]. Neddylacja jest procesem odwracalnym, a w oddysocjowaniu Nedd8 od kompleksu bierze istotny udział proteaza DEN1 [126], a także kompleks sygnalizacyjny COP 9 [100, 130].

Białka Fbp (*F-box proteins*) rozpoznają i wiążą białka mające ulec ubikwitynacji. Charakteryzuje je obecność 40-aminokwasowej sekwencji tzw. *F-box*, opisaną po raz pierwszy w cyklinie E oraz występowanie specyficznych domen, takich jak WD40 czy powtórzenia leucynowe LRR, które biorą udział w interakcjach białko-białko [17, 65]. Należy podkreślić, że większość białek rozpoznawanych przez białka Fbp musi zostać przed tym ufosforylowana [55]. Białka Fbp zdolne są do tworzenia funkcjonalnych

homo- i heterodimerów. Czy zawsze jest to niezbędne do związania substratu i ewentualnie zintensyfikowania ubikwitynacji pozostaje sprawą dyskusyjną. W odróżnieniu od rodziny kullin składającej z niewielu białek, rodzina białek Fbp jest bardzo liczna i w komórkach ssaków składa się na nią kilkadziesiąt przedstawicieli [17, 65]. Są one białkami niestabilnymi, a degradacja przynajmniej niektórych z nich zależy od układu ubikwityna/proteasom 26S [29]. Mutacje i/lub amplifikacje genów kodujących białka Fbp znajdowane są w wielu komórkach nowotworowych [38], jak również w mięśniach ulegających atrofii [33].

Białko Skp1 (*S-phase kinase associated protein 1*) i prawdopodobnie kilka jego homologów występujących w komórkach ssaków, uczestniczy w wiązaniu białek Fbp (ryc. 3). Zidentyfikowano już określone domeny biorące udział w wiązaniu i obecne w białkach Skp1 i Fbp (białko Skp2), przedstawiono też przestrzenną budowę tych kompleksów [99]. W kompleksie SCF zawierającym kullinę 7 (a nie 1), nie dochodzi do interakcji kulliny z białkiem Skp 1, a jedynie z kompleksem Skp1-białko Fbp (Fbx29 [20]. Co więcej, w kompleksie SCF, w którym platformę stanowi kullina 3, w wiązaniu substratu nie uczestniczą białka Skp 1 i Fbp, a pojedyncze adaptorowe białko MEL 26 z motywem BTB (*Broad complex, Tramtrack and Bric a Brac*), łączące w sobie funkcje powyższych białek [27, 30]. Poza funkcjonowaniem w kompleksie ligazowym białko Skp1 uczestniczy także w organizacji centrosomów, a tym samym w segregacji chromosomów. Wywołane eksperymentalnie *in vivo* zaburzenia działania Skp1 pociągają za sobą tworzenie komórek wielojądrzastych, nieprawidłowe rozchodzenie się chromosomów, nieprawidłowości w tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego, co w efekcie prowadzi do niestabilności genetycznej i transformacji nowotworowej [92].

Ze względu na możliwość bardzo wielu kombinacji poszczególnych podjednostek tworzone są różne kompleksy SCF, o wybiórczej specyficzności w stosunku do określonych białek. Sprawia to, że ligazy SCF ubikwitynują bardzo dużo białek, do których należą przede wszystkim cykliny oraz inhibitory kinaz cyklino-zależnych działające w fazie G1 cyklu komórkowego, białko Cdc6 (*DNA replication factor*), czynnik transkrypcyjny E2F, β -katenina, inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF κ B (białko I κ B) i wiele innych [19, 36, 117,121].

2.1.1. Ligaza – Parkina

Nietypową ligazą ubikwitynową typu SCF jest Parkina, która przeprowadza ubikwitynację różnych białek neuronalnych, w tym α -synukleiny [110], białka CDCrel-1 związanego z pęcherzykami synaptycznymi [137], a także cykliny E [16, 110]. Parkina tworzy kompleks z kulliną 1 i białkiem Fbp (hSel-10), nie wiąże się natomiast ze składnikami typowych ligaz SCF – białkami Skp1 i ROC1 [110]. Jest białkiem, w którego C-końcu są aż dwie domeny RF, rozdzielone domeną IBR (*In Between Ring*), biorące udział w wiązaniu enzymu E2 (domeny RF2 i IBR) i uczestniczące także prawdopodobnie w rozpoznawaniu i wiązaniu substratu (domena RF1). N-końcowy fragment cząsteczki Parkiny z domeną UHD (*Ubiquitin-Homology Domain*) jest natomiast odpowiedzialny za jej interakcję z proteasomem. Wiadomo ponadto, że Parkina może także tworzyć kompleksy z licznymi białkami, takimi jak: białko szoku cieplnego HSP70, współdziałające z HSP70, białko CHIP (*Carboxyl Terminus of Hsc70-*

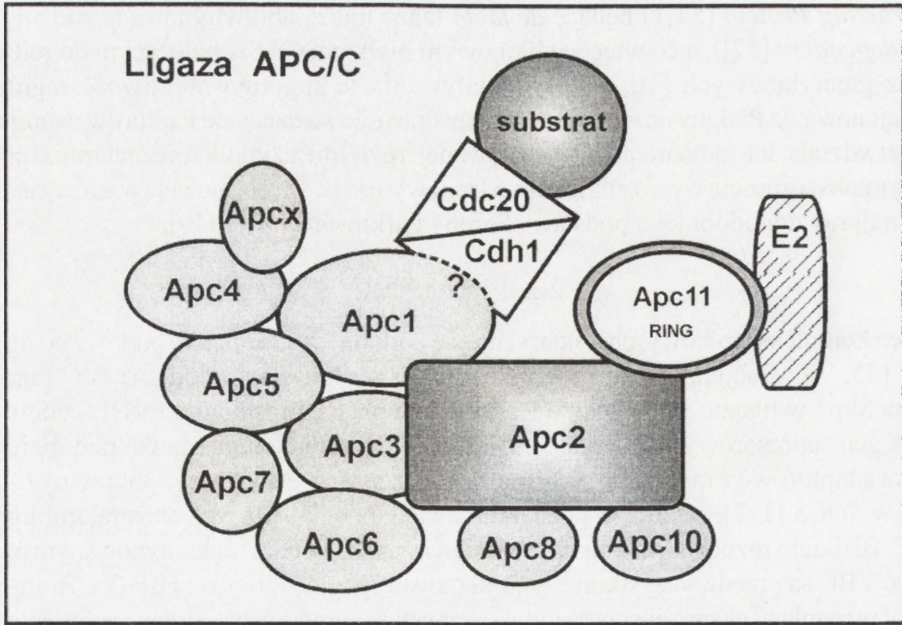
Interacting Protein [54]) i będące *de facto* także ligazą ubikwitynową (z rodziny *U-box-dependent* [57]), a co więcej z błonowym białkiem CASK należącym do rodziny kinaz guanylanowych [16, 22]. Oddziaływania te sugerują możliwość regulacji funkcjonowania Parkiny na wielu poziomach. Prawidłowe działanie Parkiny w neuronach przeciwdziała ich degeneracji wywoływanej różnymi czynnikami, ochrania przed ekscytotoksycznością wywołaną kwasem kainowym, a co więcej mutacje w genie *parkiny* leżą najprawdopodobniej u podstaw choroby Parkinsona [106, 110].

2.2. Ligaza VBC

Ten kompleks białkowy charakteryzuje się podobnym schematem budowy co ligazy SCF [55, 90]. Podjednostkami tego kompleksu są: kullina 2, elongina B/C (analog białka Skp1 w ligazie SCF), białko Rbx 1 z domeną RF oraz białko pVHL kodowane przez gen supresorowy *VHL* (ryc. 3). Białko pVHL funkcjonuje prawdopodobnie jak białka adaptorowe z motywem *F-box*, a w jego cząsteczce występuje pokrewny *F-box* motyw *SOCS* [117]. Jak dotąd poznano niewiele białek będących substratami ligazy VBC. Białkiem rozpoznawanym oraz wiązonym przez pVHL i ubikwitynowanym przez ligazę VBC są przede wszystkim czynniki transkrypcyjne HIF-1 α i HIF-2 α . Biorą one udział w regulacji ekspresji genów indukowanych w komórkach podczas niedotlenienia, takich jak np. czynnik wzrostu komórek endotelialnych, VEGF. Przy braku białka pVHL lub w obecności jego zmutowanych form (choroba von Hippel-Lindau), zostaje zaburzone działanie ligazy VBC, powodujące w efekcie konstytutywną ekspresję czynników HIF, aktywację ekspresji VEGF i w efekcie przyspieszenie procesów angiogenezy i nowotworzenia [13]. Ostatnio doniesiono, że substratami ligazy VBC mogą też być niektóre enzymy (VDU1 i VDU2) deubikwitynujące białka uprzednio wyznakowane ubikwityną, co stwarza nowe możliwości regulacyjne [71].

2.3. Ligaza APC/C

W komórkach wyższych organizmów eukariotycznych kompleks ligazy APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) tworzy kilkanaście podjednostek, w których stałymi składnikami są białka APC2 i APC11, homologiczne z kulliną 1 oraz białkiem ROC1/Rbx1 w ligazie SCF (ryc. 4 [55, 88]). Białko APC2, podobnie jak kullina, stanowi platformę, do której dołączają się inne podjednostki, natomiast białko APC11 pośredniczy prawdopodobnie w interakcji APC2 z przenoszącym ubikwitynę odpowiednim białkiem E2 [114]. Znaczenie funkcjonalne pozostałych podjednostek nie jest jeszcze w pełni poznane, chociaż obecność w nich sekwencji aminokwasowych, takich jak motywy WD40 czy też TPR, wskazuje na ich udział w oddziaływaniach pomiędzy białkami, a występowanie domeny DOC – na udział w wiązaniu np. cukrów, fosfolipidów czy nukleotydów [119]. Podjednostki te nie biorą natomiast udziału w rozpoznawaniu i wiązaniu białek mających ulec ubikwitynacji. Funkcje te pełnią dwa odrębne białka regulatorowe – Cdc20/Fizzy oraz Cdh1/Fizzy-related, w których nie występuje motyw *F-box*, natomiast aż siedem domen WD. Nie wiadomo jednak, czy właśnie przez te domeny dochodzi do rozpoznania i związania białkowych substratów. Ufosforylowanie zarówno kompleksu APC, jak i współdziałających z nim białek



RYCINA 4. Schemat budowy ligazy APC/C (wg [88, 55] zmodyfikowane)

regulatorowych jest istotne dla funkcjonowania ligazy APC/C, przy czym fosforylacja może zarówno aktywować, jak i hamować to działanie. Fosforylacji dokonują kinazy cyklino-zależne, kinazy Polo, a także być może kinaza A [36]. Co więcej, ligaza APC/C pozostaje także pod wpływem niektórych białek z rodzin MAD i BUB, które po uaktywnieniu punktu kontrolnego wrzeczona kariokinetycznego tworzą przejściowe kompleksy z białkiem Cdc20, wyłączając w ten sposób działanie ligazy i zatrzymując komórki w metafazie [37]. Proces ten jest bardzo złożony i został tutaj tylko zasygnalizowany. W ostatnich latach poznano mechanizm odpowiedzialny za inaktywację ligazy APC/C w interfazie. Bierze w nim udział białko Emil/Rca1, którego syntezę reguluje czynnik transkrypcyjny E2F, a degradację poprzedza ubiquitynacja przeprowadzana przez ligazę SCF [79, 95].

W odróżnieniu od ligaz SCF ubiquitynujących bardzo wiele białek, ligaza APC/C dołącza ubiquitynę do niewielu białkowych substratów, w zależności od momentu w którym wchodzi w interakcje z różnymi podjednostkami regulatorowymi. W znakomitej większości białek ubiquitynowanych przez APC występują tzw. sygnały destrukcyjne, jak „*D-box*” czy „*KEN-box*”, nie wiadomo jednak, czy właśnie one biorą udział w wiązaniu podjednostek Cdc20 lub Cdh1 [55]. Substratami są przede wszystkim białka bezpośrednio zaangażowane w przebieg mitozy (sekuryna – inhibitor anafazy i rozdziału chromatyd, cykliny mitotyczne A i B), własne białka regulatorowe Cdc20 i Cdh1, kinaza Polo, białko Ase wiążące się z mikrotubulami, a także geminina uczestnicząca w regulacji syntezy DNA [36, 37, 121].

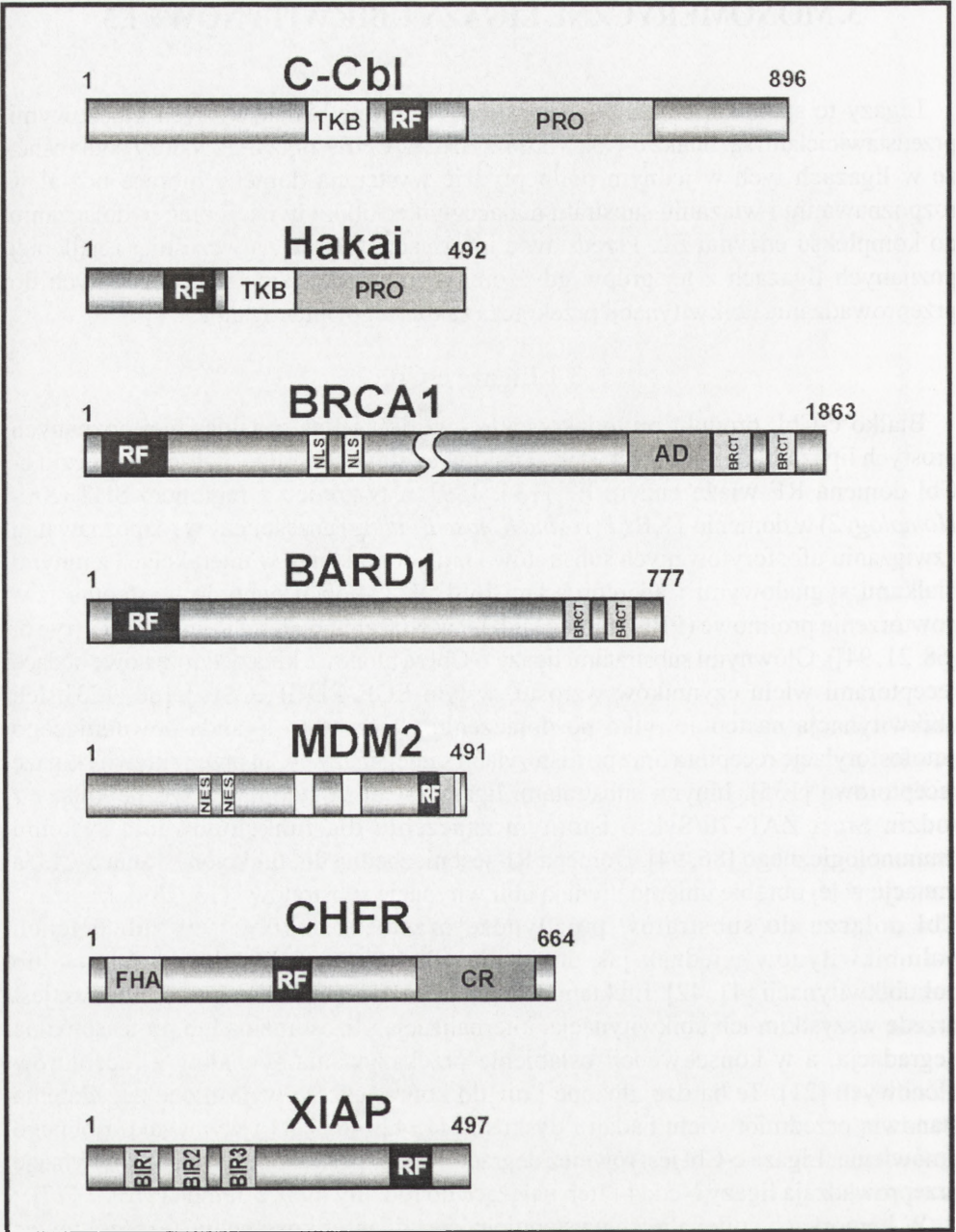
3. MONOMERYCZNE LIGAZY UBIKWITYNOWE E3

Ligazy te stanowią ciągle powiększającą się grupę białek, których kluczowymi przedstawicielami są: białka c-Cbl, MDM2, BRCA, CHFR oraz IAP. Należy podkreślić, że w ligazach tych w jednym polipeptydzie występują domeny biorące udział w rozpoznawaniu i wiązaniu substratu mającego ulec ubikwitynacji oraz w dołączaniu do kompleksu enzymu E2. Przedstawię informacje tylko o najwcześniej i najlepiej poznanych ligazach z tej grupy, gdyż omówienie wszystkich białek zdolnych do przeprowadzania ubikwitynacji przekracza zakres tego opracowania.

3.1 Ligaza c-Cbl

Białko c-Cbl, produkt protoonkogeny *c-cbl*, jest jedną z najdawniej poznanych prostych ligaz ubikwitynowych [59]. Znajdująca się w centralnej części cząsteczki c-Cbl domena RF wiąże enzym E2 [134, 139], a N-koniec z regionem SH2 (*Src-Homology2*) w domenie TKB (*Tyrosine Kinase Binding*) uczestniczy w rozpoznawaniu i związaniu ufosforylowanych substratów i prawdopodobnie w interakcjach z innymi białkami sygnałowymi i adaptorowymi [68]. W C-końcu peptydu występują tzw. powtórzenia prolinowe (PRO) biorące udział w wiązaniu białek z domeną SH3 (ryc 5, [68, 21, 94]). Głównymi substratami ligazy c-Cbl są błonowe kinazy tyrozynowe będące receptorami wielu czynników wzrostu, w tym EGF, PDGF, CSF-1 [68, 123]. Ich ubikwitynacja następuje tylko po dołączeniu właściwego liganda powodującego autofosforylację receptora oraz po fosforylacji samej ligazy c-Cbl przez aktywną kinazę receptorową [135]. Innymi substratami ligazy c-Cbl są cytoplazmatyczne kinazy z rodzin Src i ZAP-70/Syk o istotnym znaczeniu dla funkcjonowania systemu immunologicznego [86, 94]. Domena RF jest niezbędna dla funkcjonowania c-Cbl, a mutacje w jej obrębie uniemożliwiają ubikwitynację substratów [115, 139]. Ligaza c-Cbl dołącza do substratów pojedyncze cząsteczki ubikwityny lub łańcuch poliubikwitynowy, jednak jak dotąd nie wiadomo, co decyduje o mono- lub poliubikwitynacji [41, 42]. Efektem działania ligazy c-Cbl na receptory błonowe jest przede wszystkim ich ubikwitynacja, internalizacja i lizosomalna lub proteasomalna degradacja, a w konsekwencji osłabienie przekazywania sygnałów z receptorów błonowych [21]. Te bardzo złożone i nie do końca jeszcze wyjaśnione zagadnienia stanowią przedmiot wielu badań i dyskusji [41, 42, 46, 111] i wymagają osobnego omówienia. Ligaza c-Cbl jest również degradowana w proteasomie, a jej ubikwitynację przeprowadzają ligazy Nedd4 i Itch należące do rodziny ligaz z domeną *HECT* [77].

W komórkach epitelialnych występuje także, zidentyfikowane w 2002, pokrewne ligazie c-Cbl białko HAKAI, charakteryzujące się jednak odmiennym usytuowaniem domen RF i domeny TKB (ryc. 5 [26]). Ubikwitynuje ono kadherynę E będącą w kompleksie z β -kateniną i indukuje internalizację tego kompleksu, dzięki czemu może modulować adhezję komórek.



RYCINA 5. Schemat budowy przedstawicieli monomerycznych ligaz ubikwitynowych (wg [2, 8, 18, 21, 26, 47, 60, 62, 94, 101] zmodyfikowane)

3.2. Ligaza MDM2

Białko MDM2 (*Mouse Double Minute 2*), produkt genu *mdm2*, często o zwielokrotnionej ekspresji w komórkach nowotworowych, jest jedną z najlepiej poznanych prostych ligaz ubikwitynowych. Od początku lat 90-tych XX wieku wiadomo o nim, że odznacza się wysoką aktywnością transformującą i jest jednym z najważniejszych białek kompleksujących z białkiem supresorowym p53 i w efekcie wyłączających jego funkcjonowanie [25]. Mechanizmy odpowiedzialne za to działanie MDM2 to hamowanie aktywności transkrypcyjnej p53 w wyniku połączenia z jego domeną transaktywacyjną i promowanie, dzięki funkcjonowaniu jako ligaza ubikwitynowa, szybkiej degradacji białka p53 [23, 48]. Białko MDM2, podobnie jak inne proste ligazy ubikwitynowe, charakteryzuje budowa domenowa (ryc.5). W pobliżu C-końca występuje domena RF, niezbędna do przejawiania przez nie aktywności ligazowej [49], N-koniec uczestniczy w wiązaniu białka p53, natomiast z częścią środkową cząsteczki mogą wiązać się takie białka pełniące istotne funkcje regulacyjne w cyklu komórkowym, jak: pRb, p300, E2F i pARF. W cząsteczce MDM2 wstępują również sekwencje NLS, NES i NoLS, odpowiedzialne za występowanie MDM2 w jądrze komórkowym, cytoplazmie bądź w jąderku i jego przemieszczanie się pomiędzy tymi subkompartamentami komórkowymi [18].

Ekspresję genu *mdm2* indukuje przede wszystkim białko p53 działające jako czynnik transkrypcyjny wiążący się z odpowiednimi sekwencjami w promotorze *mdm2* [25, 80]. Dzięki temu może następować, działająca na zasadzie sprzężenia zwrotnego, regulacja wewnątrzkomórkowego poziomu tych białek. Transkrypcyjna regulacja poziomu MDM2 jest przejściowa, ponieważ czynniki hamujące ekspresję *mdm2* (szok cieplny, niedotlenienie, promieniowanie UV, niektóre leki przeciwnowotworowe) wywołują zarazem wzrost poziomu p53, a ten z kolei indukuje ekspresję *mdm2* [6, 18].

Potranslacyjne modyfikacje MDM2 to przede wszystkim jego fosforylacja przeprowadzana przez wiele kinaz białkowych (ATM, DNA-PK, kinaza kazeinowa 2, kinaza Akt/PKB) [82, 105], ale również defosforylacja w odpowiedzi np. na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem jonizującym [4]. Podczas gdy fosforylacja MDM2 (np. przez Akt) zwiększa zdolność MDM2 do ubikwitynacji p53 i promuje jego degradację, to hypofosforylacja wydaje się być związana z osłabieniem jego działania i stabilizacją p53. Przypuszcza się, że tylko ufosforylowane MDM2 może wiązać niezidentyfikowany jeszcze czynnik niezbędny do degradacji p53, a defosforylacja uniemożliwia ten proces [4]. Inną modyfikacją potranslacyjną MDM2 jest sumoylacja polegająca na dołączeniu do MDM2 pokrewnej ubikwitynie cząsteczki SUMO-1 (*Small Ubiquitin-like Modifier*). Uniemożliwia ona autoubikwitynację białka MDM2 oraz zwiększa jego aktywność jako ligazy E3 w stosunku do p53 [9]. Sumoylacja jest także zaangażowana w regulację integralności genomu, działanie różnych czynników transkrypcyjnych oraz szlaków przekazywania sygnałów itd. [102]. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA ma miejsce obniżenie sumoylacji MDM2 i wzrost poziomu p53. W regulacji sumoylacji MDM2 bierze również udział białko supresorowe p14ARF, promując akumulację w komórkach zmodyfikowanych cząsteczek MDM2 [128]. Jest to nowa funkcja białka ARF, o którym dotychczas było wiadomo, że kompleksuje z

MDM2 i jest odpowiedzialne za jego jąderkową lokalizację, a tym samym za odseparowanie od p53 [50, 124, 138]. Działanie MDM2, jako ligazy ubikwitynowej, jest także modulowane przez pokrewne mu białko MDMX, również wykazujące aktywność ligazową *in vitro* i mogące ulegać autoubikwitynacji [3, 89], oraz przez wiele innych białek regulujących przebieg cyklu komórkowego, w tym pRb i czynnik transkrypcyjny E2F-1 [18]. Wewnątrzkomórkowy poziom białka MDM2 jest najwyższy w fazie S cyklu komórkowego, obniża się zaś w fazie G2 i podczas mitozy, co wskazuje na jego degradację. Od dawna wiadomo jest, że MDM2 może ulegać autoubikwitynacji i promować w ten sposób własną degradację [23]. Wysuwana jest też ostatnio sugestia, że degradację MDM2 może też przeprowadzać inna niż MDM2 ligaza ubikwitynowa [39].

Ligaza MDM2 wywołuje zarówno mono- jak i poliubikwitynację p53 [69]. Ostatnio doniesiono, że przy niskim poziomie MDM2 zachodzi monoubikwitynacja p53 i jego wytransportowywanie z jądra, natomiast w obecności znacznych ilości MDM2 dochodzi do poliubikwitynacji p53 i jego degradacji w jądrze. Należy sobie zdawać sprawę, że mono i poliubikwitynowane pochodne p53 mogą pełnić w komórce różne funkcje.

Zagadnienie, w którym kompartmentie komórki dochodzi do degradacji p53 z udziałem MDM2, jest ciągle intensywnie badane i szereg danych wskazuje, że degradacja może zachodzić zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym, a czynnikiem niezbędnym jest współwystępowanie tych dwóch białek [136, 129]. Ostatnio wykazano, że poliubikwitynacja p53 przez MDM2 może być „wspomagana” przez białko koaktywatorowe p300, które również wykazuje aktywność ligazy ubikwitynowej [34]. Co więcej, mutanty MDM2 niezdolne do wiązania p300, ubikwitynują p53, ale nie promują jego degradacji. Wydaje się to wskazywać na udział białka p300 w integracji procesów ubikwitynacji i proteolizy [141]. Należy dodać, że różne potranslacyjne modyfikacje samego białka p53 są również bardzo istotne w jego interakcjach z MDM2 i decydują w znacznej mierze o jego stabilności [6]. Chociaż MDM2 jest główną ligazą odpowiedzialną za proteasomalną degradację p53, to wiadomo także, że białko to może być ubikwitynowane też przez inne ligazy z domeną RF [66], ligazy z domeną *HECT* oraz ulegać proteolizie nie w proteasomie, a pod wpływem innych proteaz.

Działanie MDM2 jako ligazy nie ogranicza się tylko do regulacji poziomu p53. Substratem MDM2 może być też receptor androgenowy AR, zwłaszcza po ufosforylowaniu przez kinazę Akt i to zarówno białka MDM2, jak i receptora [72], a także jeden z inhibitorów cyklu komórkowego – białko p21 [58].

3. BIAŁKO BRCA1

Białka BRCA1 i BRCA2 (*Breast Cancer type susceptibility protein*), to produkty genów, których mutacje, delecje czy też inaktywacje leżą często u podłoża nowotworów, zwłaszcza nowotworów piersi. Biorą one udział w wielu różnych procesach komórkowych, w tym w regulacji transkrypcji wielu genów (np. kodujących cyklinę B1, PCNA, białko GADD45), w reparacji DNA, czy też w regulacji cyklu komórkowego

[64, 76, 108, 109]. Białko BRCA1 po utworzeniu heterodimeru z białkiem BARD1 (*BRCA1-Associated Ring Domain 1*), również zawierającym domenę RF, bierze również udział w degradacji białek wykazując aktywność ligazy ubikwitynowej [2, 44, 78]. W interakcji białek wchodzących w skład tego aktywnego heterodimeru są zaangażowane domeny RF znajdujące się w ich N-końcowych fragmentach [7,8], natomiast C-terminalnie usytuowane domeny BRCT (ryc.5) biorą udział w oddziaływaniach z innymi białkami. Należy przy tym zaznaczyć, że samo białko BARD1 nie przejawia istotnej aktywności ligazy [127].

Substratami ligazy BRCA1/BARD1 są prawdopodobnie takie białka, jak: polimeraza RNA II, białko FANCD2 (*Fanconi anemia subtype D2 protein*), histon H2A [2, 64], a także sam kompleks ligazowy [10, 78], przy czym możliwa jest zarówno mono-, jak i poliubikwitynacja substratów, co z pewnością w różny sposób wpływa na ich funkcjonowanie. Sugeruje się, że po uszkodzeniach DNA może wzrastać katalityczna aktywność ligazy, zwłaszcza wobec polimerazy RNA II, co po jej degradacji może zezwalać na lepszą rekrutację czynników reperujących uszkodzone DNA przyczyniając się do wzrostu stabilności genomu i ułatwiać właściwą odpowiedź komórki na stres [64, 109].

3.4. Ligaza CHFR

W 2002 roku wykazano, że jako ligazę ubikwitynową można traktować także białko CHFR [62], które działa w punkcie kontrolnym cyklu komórkowego w profazie podziału mitotycznego i monitoruje kondensację chromosomów i ruch centrosomów ku biegunom komórki [101]. W białku CHFR (*Checkpoint with FHA and RING finger*) wyróżnia się 3 domeny – w N-końcu domenę FHA (*Forkhead Associated*), w centralnej RF i na C-końcu region bogaty w cysteinę (*CR, Cysteine Rich*) (ryc.5). Poprzez domenę RF następuje dołączenie enzymu E2, natomiast domena FHA uczestniczy w wiązaniu fosfopeptydów. Pierwotnie zidentyfikowano ją w czynnikach transkrypcyjnych, później znaleziono także w kinazie Chk2 i białku Rad53. Jej brak lub modyfikacje upośledzają wiązanie CHFR z innymi białkami. W wielu ludzkich nowotworach (nowotwory odbytu, głowy i szyi, szereg linii komórek nowotworowych) ma miejsce epigenetyczna inaktywacja CHFR następująca w wyniku wyciszenia ekspresji genu *Chfr* poprzez metylację reszt cytozyny i guaniny w DNA [81, 104, 116].

Ligaza CHFR katalizuje *in vitro* swoją własną ubikwitynację, a jej podstawowym substratem jest kinaza Polo, Plk1 [62]. Udział kinazy Plk1 w regulacji cyklu komórkowego staje się coraz bardziej doceniany i wyjaśniony. Jest ona bowiem w znacznym stopniu odpowiedzialna za odpowiedni poziom ufosforylowania, a tym samym aktywności, fosfatazy Cdc25, która aktywuje kinazy cyklino-zależne, hamuje zaś kinazę wee [31]. Ubikwitynacja Plk1 i jej następcza degradacja, opóźniają fosforylację, a tym samym aktywację fosfatazy Cdc25, która jest aktywna w stanie „hiperfosforylowanym”. Dalszą konsekwencją są zaburzenia aktywacji kinaz cyklino-zależnych i zatrzymanie komórek w cyklu komórkowym.

3.5. Białka IAP

Zidentyfikowane na początku lat dziewięćdziesiątych XX wieku białkowe inhibitory apoptozy, białka IAP (*Inhibitory Apoptosis Proteins*) to polipeptydy o różnej długości,

w których N-końcu występuje zawsze jedna lub kilka ułożonych tandemowo domen BIR (*Baculovirus IAP-like Repeats*) oraz często w C-końcu domena RF (ryc.5, [35, 56, 47]) Obecność domeny BIR jest niezbędna dla antyapoptotycznego działania białek IAP, przejawiającego się przede wszystkim jako hamowanie aktywności kaspaz działających po zaktywowaniu błonowych receptorów śmierci, jak i w tzw. mitochondrialnym szlaku apoptozy. Natomiast domena RF białek IAP uczestniczy, jak wiadomo od 2000 roku, w funkcjonowaniu ich również jako ligaz ubikwitynowych [113, 131]. W odpowiedzi na różne bodźce prowadzące do apoptozy, białka IAP (c-IAP1/2 i XIAP) ubikwitynują niektóre kaspazy, zwłaszcza kaspazy 3 i 7 [53, 113], bądź też same ulegają autoubikwitynacji [131]. Efektem tych działań jest zatem degradacja zarówno egzekutorów (kaspazy), jak i inhibitorów apoptozy. Substratem ligazy ubikwitynowej XIAP okazało się też być mitochondrialne białko SMAC/DIABLO (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*), które kompleksując z białkami IAP i uniemożliwia hamowanie przez nie kaspaz [52, 75], substratem zaś ligazy cIAP1 jest białko TRAF2 współdziałające podczas apoptozy z receptorem śmierci TNF-RII [70].

4. UWAGI KOŃCOWE

Proteoliza zachodząca z udziałem układu ubikwityna/proteasom kontroluje wiele procesów krytycznych dla biologii prawidłowych i uszkodzonych komórek. W ostatnich latach poznano i wyjaśniono już wiele molekularnych mechanizmów regulujących funkcjonowanie tego układu. Nie ma też wątpliwości, że zaburzenia jego działania mogą być przyczyną różnych schorzeń, a także często nieefektywności stosowanych terapii [12]. Tak więc opracowanie metod farmakologicznej interwencji w te procesy proteolityczne staje się wyzwaniem w dalszych badaniach. Ligazy ubikwitynowe E3 stanowiące ostatnie ogniwo w ubikwitynacji białkowych substratów wydają się być właściwym celem w terapii [24, 93, 112]. Podejmowane są próby opracowania metod oznaczania aktywności ligaz E3 oraz pomiarów przeniesienia energii podczas ubikwitynacji, co być może ułatwi zsyntetyzowanie specyficznych, niskocząsteczkowych inhibitorów [112]. Innym podejściem terapeutycznym wydaje się być metoda umożliwiająca precyzyjne kierowanie wybranych białek na drogę proteolizy przy użyciu syntetyzowanych chimerycznych białek adaptorowych typu PROTAC (*Proteolysis Targeting Chimeric molecule*, [96]), czy też chimerycznych ligaz ubikwitynowych zawierających dwie domeny RF [87]. PROTAC, składający się z określonego fosfopeptydu (pochodzącego z I κ B α) i kowalencyjnie związanego z nim estradiolu lub dihydrosteronu, wprowadzony do komórek powodował w nich proteosomalną degradację i spadek poziomu receptorów obydwu hormonów [96]. Podobnie, kotransfekcja komórek ligazą E3 z dwiema domenami RF i fragmentem białka PCNA rozpoznającym i wiążącym p57, inhibitor cyklu komórkowego, wywoływała jego degradację i przywracała wzrost komórek [87]. Czy metody te znajdą zastosowanie w przypadku i innych białek pokażą dalsze badania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARAVIND L, KOONIN EV. The U box is a modified RING finger – a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* 2002; **10**:R132–R134.
- [2] BAER R, LUDWIG T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Gen & Dev* 2002; **12**: 86–91.
- [3] BADCIONG JC, HAAS AL. MdmX is a RING finger ubiquitin ligase capable of synergistically enhancing Mdm2 ubiquitination. *J Biol Chem* 2002; **277**: 49688–49675.
- [4] BLATTNER C, HAY T, MEEK DW, LANE DP. Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6170–6182.
- [5] BORDEN KLB. RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 2000; **295**: 1103–1112.
- [6] BROOKS CL, GU W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 164–171.
- [7] BRZOVIC PS, KEEFFE JR, NISHIKAWA H, MIYAMATO K, FOX D III, FUKUDA M, OHTA T, KLEVIT R. Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5646–5651.
- [8] BRZOVIC PS, RAJAGOPAL P, HOYT WD, KING MC, KLEVIT RE. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nature Struct Biol* 2001; **8**: 833–837.
- [9] BUSCHMANN T, FUCHS SY, LEEC G, PAN ZQ, RONAI Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 2000; **101**:732–762.
- [10] CHEN A, KLEIMAN FE, MANLEY JL, OUCHI T, PAN ZQ. Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2002; **277**: 22085–22092.
- [11] CIECHANOVER A, ORIAN A, SCHWARTZ AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 2000; **22**: 442–451.
- [12] CIECHANOVER A, ORIAN A, SCHWARTZ AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem, suppl* 2000; **34**: 40–51.
- [13] CLIFFORD SC, MAHER ER. Von Hippel-Lindau disease: clinical and molecular perspectives. *Adv Cancer Res* 2001; **82**: 85–105.
- [14] CONAWAY RC, BROWER CHS, CONAWAY JW. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 2002; **296**: 1254–1258.
- [15] COSCOY L, GANEM D. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol*. 2003; **13**: 7–12.
- [16] COOKSON MR. Neurodegeneration: how does Parkin prevent Parkinson's disease? *Curr Biol* 2003; **13**: 522–524.
- [17] CRAIG KL, TYERS M. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; **72**: 299–328.
- [18] DAUJAT S, NEEL H, PIETTE J. MDM2: life without p53. *Trends Genet* 2001; **17**: 459–464.
- [19] DESTERRO JMP, RODRIGUEZ MS, HAY RT. Regulation of transcription factors by protein degradation. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 1207–1219.
- [20] DIAS DC, DOLIOS G, WANG R, PAN ZQ. CUL7: a DOC domain-containing cullin selectively binds SKP1 Fbx29 to form an SCF-like complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16601–16606.
- [21] DIKIC I, GIORDANO S. Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 128–135.
- [22] FALLON L, MOREAU F, CROFT BG, LABIB N, GU WJ, FON EA. Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem* 2002; **277**: 486–491.
- [23] FANG S, JENSEN JP, LUDWIG RL, VOUSDEN KH, WEISSMAN AM. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 2000; **275**: 8945–8951
- [24] FANG S, LORICK KL, JENSEN JP, WEISSMAN AM. RING finger ubiquitin ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. *Seminars Cancer Biol* 2003; **13**: 5-14.
- [25] FREEDMAN DA, WU L, LEVINE AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 1999; **55** 96–107.
- [26] FUJITA Y, KRAUSE G, SCHEFFNER M, ZECHNER D, LEDDY HEM, BEHRENS J, SOMMER T, BIRCHMEIER W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biol* 2002; **4**: 222–231.

- [27] FURUKAWA M, HE YJ, BORCHERS C, XIONG Y. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nature Cell Biol* 2003; **5**: 1001–1007.
- [28] FURUKAWA M, OHTA T, XIONG Y. Activation of UBC5 ubiquitin-conjugating enzyme by the RING finger of ROC1 and assembly of active ubiquitin ligases by all cullins. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15758–15765.
- [29] GALAN JM, PETER M. Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 9124–9129.
- [30] GEYER R, WEE S, ANDERSON S, YATES J III, WOLF DA. BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 2003; **12**: 783–790.
- [31] GLOVER D, M. HAGAN IM, TAVARES AAM. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Develop* 1998; **12**: 3777–3787.
- [32] GMACHL M, GIEFFERS C, PODTELEJNIKOV AV, MANN M, PETERS JM. The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8973–8978.
- [33] GOMEZ MD, LECKER SH, JAGOE RT, NAVON A, GOLDBERG AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**: 1440–14445.
- [34] GROSSMAN SR, DEATO MA, BRIGNONE C, CHAN HM, KUNG AL, TAGAMI H, NAKATANI Y, LIVINGSTON DM. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 2003; **300**: 342–344.
- [35] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek. *Post Biochem* 1999; **45**: 167–176.
- [36] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubikwitynacji. *Post Biochem* 2002; **48**: 34–47.
- [37] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Punkty kontrolne cyklu komórkowego, czy znamy ich molekularne podłoże? *Post Biol Kom* 2002; **29**: 157–175.
- [38] GSTEIGER M, JORDAN L, LIM M, CATZAVELLOS C, MESTA J, SLINGERLAND J, KREK W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 5043–5048.
- [39] GU L, YING H, ZHENG H, MURRAY SA, XIONG ZXJ. The MDM2 RING finger is required for cell cycle-dependent regulation of its protein expression. *FEBS Lett* **544**: 218–222.
- [40] GUTERMAN A, GLICKMAN MH. Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1729–1738.
- [41] HAGLUND K, DI FIORE PP, DIKIC I. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 598–603.
- [42] HAGLUND K, SIGISMUND S, POLO S, SZYMKIEWICZ I, DI FIORE PP, DIKIC I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 461–466.
- [43] HARTMANN-PETERSEN R, SEEGER M, GORDON C. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 26–31.
- [44] HASHIZUME R, FUKUDA M, MAEDA I, NISHIKAWA H, OYAKE D, YABUKI Y, OGATA H, OHTA T. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 14537–14540.
- [45] HATAKEYAMA S, YADA M, MATSUMOTO M, ISHIDA N, NAKAYAMA KI. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 2001; **276**: 33111–33120.
- [46] HICKE L. Getting' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 107–112.
- [47] HOLCIK M, KORNEŁUK RG. XIAP, the guardian angel. *Nature Rev, Mol Cell Biol* 2001; **2**: 550–556.
- [48] HONDA R, TANAKA H, YASUDA H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997; **420**: 25–27.
- [49] HONDA R, YASUDA H. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 2000; **19**: 1473–1476.
- [50] HONDA R, YASUDA H. Association of p19 (ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* 1999; **18**: 22–27.
- [51] HORI T, OSAKA F, CHIBA T, MIYAMOTO C, OKABAYASHI K, SHIMBARA N, KATO S, TANAKA K. Covalent modification of all members of human cullin family protein by NEDD8. *Oncogene* 1999; **18**: 6829–6834.
- [52] HU S, YANG X. Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 2003; **278**: 10055–10060.

- [53] HUANG H, JOAZEIRO CA, BONFOCO E, KAMADA S, LEVERSON JD, HUNTER T. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes *in vitro* monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26661–26664.
- [54] IMAI Y, SODA M, HATAKEYAMA S, AKAGI T, HASHIKAWA T, NAKAYAMA KI, TAKAHASHI R. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 2002; **10**: 55–67.
- [55] JACKSON PK, ELDRIDGE AG, FREED E, FURSTENTHAL L, HSU JY, KAISER BK, REIMANN JDR. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 429–439.
- [56] JESENBERGER V, JENTSCH S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nature Rev, Mol Cell Biol* 2002; **3**: 112–121.
- [57] JIANG J, BALLINGER CA, WU Y, DAI Q, CYR DM, HOHFELD J, PATTERSON C. CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 42938–42944.
- [58] JIN Y, LEE H, ZHENG SX, DAI MS, LU H. MDM2 promotes p21^{waf1/cip1} proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *EMBO J* 2003; **22**: 6365–6377.
- [59] JOAZEIRO CAP, WING SS, HUANG H, LEVERSON JD, HUNTER T, LIU YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999; **286**: 309–312.
- [60] JOAZERIO CAP, WEISSMAN AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000; **102**: 549–552.
- [61] KAMURA T, KOEPP DM, CONRAD MN, SKOWYRA D, MORELAND RJ, ILIOPOULOS O, LANE WS, KAELIN WG Jr, ELLEDGE SJ, CONAWAY RC, HARPER JW, CONAWAY JW. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999; **284**: 657–661.
- [62] KANG D, CHEN J, WONG J, FANG G. The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *J Cell Biol* 2002; **156**: 249–259.
- [63] KAWAKAMI T, CHIBA T, SUZUKI T, IWAI K, YAMANAKA K, MINATO N, SUZUKI H, SHIMBARA N, HIDAKA Y, OSAKA F, OMATA M, TANAKA K. NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *EMBO J* 2001; **20**: 4003–4012.
- [64] KERR P. New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Curr Biol* 2001; **11**: R668–676.
- [65] KIPREOS ET, PAGANO M. The F-box protein family. *Genome Biology* 2000; **1**: 3002.1–3002.7.
- [66] LENG RP, LIN Y, MA W, WU H, LEMMERS B, CHUNG S, PARANT JM, LOZANO G, HAKEM R, BENCHIMOL S. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 2003; **112**: 779–791.
- [67] LEVERSON JD, JOAZEIRO CA, PAGE AM, HUANG H, HIETER P, HUNTER T. The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 2315–2325.
- [68] LEVKOWITZ G, WATERMAN H, ETENBERG SA, KATZ M, TSYGANKOV Y, ALROY I, LAVI S, IWAI K, REISS Y, CIECHANOVER A, LIPKOWITZ S, YARDEN Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli1. *Mol Cell* 1999; **4**: 1029–1040.
- [69] LIM M, BROOKSC L, WU-BAER F, CHEN D, BAER R, GU W. Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 2003; **302**: 1972–1975.
- [70] LI X, YANG Y, ASHWELL JD. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 2002; **416**: 345–347.
- [71] LI Z, WANG D, NA X, SCHOEN SR, MESSING EM, WU G. Identification of a deubiquitinating enzyme subfamily as substrates of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **294**: 700–709.
- [72] LIN HK, WANG L, HU YC, ALTUWAIJRI, CHANG C. Phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J* 2002; **21**: 4037–4048.
- [73] LIU J, FURUKAWA M, MATSUMOTO T, XIONG Y. NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120^{CAND1}, an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Mol Cell* 2002; **10**: 1511–1518.
- [74] LORICK KL, JENSEN JP, FANG S, ONG AM, HATAKEYAMA S, WEISSMAN AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11364–11369.
- [75] MACFARLANE M, MERRISON W, BRATTON SB, COHEN GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination *in vitro*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 36611–36616.

- [76] MACLACHLAN TK, SOMASUNDARAM K, SGAGIAS M, SHIFMAN Y, MUSCHEL RJ, COWAN KH, EL-DEIRY WS. BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2777–2785.
- [77] MAGNIFICO A, ETTEMBERG S, YANG C, MARIANO J, TIWARI S, FANG S, LIPKOWITZ S, WEISSMAN AM, WW domain HECT E3 target Cbl Ring finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 43169–43177.
- [78] MALLERY DL, VANDENBERG CJ, HIOM K. Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO J* 2002; **21**: 6755–6762.
- [79] MARGOTTIN-GOGUET F, HSU JY, LOKTEV A, HSIEH HM, REIMANN JD, JACKSON PK. Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* 2003; **4**: 813–826.
- [80] MICHAEL D, OREN M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars Cancer Biol* 2003; **13**: 49–58.
- [81] MIZUNO K, OSADA H, KONISHI H, TATEMATSU Y, YATABE Y, MITSUDOMI T, FUJII Y, TAKAHASHI T. Aberrant hypomethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers. *Oncogene* 2002; **21**: 2328–2333.
- [82] OGAWARA Y, KISHISHITA S, OBATA T, ISAZAWA Y, SUZUKI Y, TANAKA K, MASUYAMA N, GO-TOH Y. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 2002; **277**: 21843–21850.
- [83] O'HAGAN RC, OHM M, DAVID G, DE ALBORAN IM., ALT FW, KAEHLIN WG Jr, DEPINHO RA. Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* 2000; **14**: 2185–2191.
- [84] OHTA T, MICHEL J, SCHOTTELIUS A, XIONG Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 1999; **3**: 535–541.
- [85] OHTA T, MICHEL JJ, XIONG Y. Association with cullin partners protects Roc proteins from proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 1999; **18**: 6758–6766.
- [86] OTA S, HAZEKI K, RAO N, LUPHER MLJR, ANDONIOU CE, DRUKER B BAND H. The RING finger domain of Cbl is essential for negative regulation of the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 414–422.
- [87] OYAKE D, NISHIKAWA H, KOIZUKA I, FUKUDA M, OHTA T. Targeted substrate degradation by an engineered double RING ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **295**: 370–375.
- [88] PAGE AM, HIETER P. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem* 1999; **68**: 583–609.
- [89] PAN Y, CHEN J. MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 5113–5121.
- [90] PAUSE A, PETERSON B, SCHAFFAR G, STEARMAN R, KLAUSNER R. Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 9533–9538.
- [91] PICKART CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**: 503–533.
- [92] PIVA R, LIU J, CHIARLE R, PODDA A, PAGANO M, INGHIRAMI G. *In vivo* interference with Skp1 function leads to genetic instability and neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 8375–8387.
- [93] PRAY TR, PARLATI F, HUANG J, WONG BR., PAYAN DG, BENNETT MK, ISSAKANI SD, MOLINEUX S, DEMO SD. Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resistance Updates* 2002; **5**: 249–258.
- [94] RAO N, DODGE I, BAND H. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *J Leukoc Biol* 2002; **71**: 753–763.
- [95] REIMANN JD, FREED E., HSU JY, KRAMER ER, PETERS JM, JACKSON PK. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* 2001; **105**: 645–655.
- [96] SAKAMOTO KM, KIM KB, VERMA R, RANSICK A, STEIN B, CREWS CM, DESHAIES RY. Development of PROTACs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. *Mol Cell Proteomics* 2003; **2**: 1350–1358.
- [97] SALVESEN GS, DUCKETT CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev, Mol Cell Biol* 2002; **3**: 401–410.
- [98] SAURIN AJ, BORDEN KLB, BODDY MN, FREEMONT PS. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 208–214.

- [99] SCHULMAN BA, CARRANO AC, JEFFREY PD, BOWEN Z, KINNUCAN ER, FINNIN MS, ELLEDGE SJ, HARPER JW, PAGANO M, PAVLETICH NP. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the SKP1-Skp2 complex. *Nature* 2000; **408**:381–386.
- [100] SCHWEHHEIMER C, DENG XW. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 420–426.
- [101] SCOLNIK DM, HALAZONETIS TD. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 2000; **406**: 430–435.
- [102] SCHEEL H, HOFMANN K. No evidence for PHD fingers as ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 285–287.
- [103] SEELER JS, DEJEAN A. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nature Rev, Mol Cell Biol* 2003; **4**: 690–699.
- [104] SHIBATA Y, HARUKI N, KUWABARA Y, ISHIGURO H, SHINODA N, SATO A, KIMURA M, KOYAMA H, TOYAMA T, KUDO J, TERASHITA Y, KONISHI S, SUGIURA H, FUJII Y. Chfr expression is down regulated by CpG island hypermethylation in esophageal cancer. *Carcinogenesis* 2002; **23**: 1695–1699.
- [105] SHIMIZU H, HUPP TR. Intrasteric regulation of MDM2. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 346–349.
- [106] SHIMURA H, NOBUTAKA H, KUBO S, MIZUNO Y, ASAKAWA S, MINOSHIMA S, SHIMIZU N, IWAI K, CHIBA T, TANAKA K, SUZUKI T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genet* 2000; **25**: 302–305.
- [107] SKOWYRA D, KOEPP DM, KAMURA T, CONRAD MN, CONAWAY RC, CONAWAY JW, ELLDGE SJ, HARPER JW. Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* 1999; **284**: 662–665.
- [108] SOMASUNDARAM K. Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair – perhaps through transcription. *J Cell Biochem* 2003; **88**: 1084–1091.
- [109] STARITA LM, PARVIN JD. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 345–350.
- [110] STAROPOLI JF, MCDERMOTT C, MARTINAT C, SCHULMAN B, DEMIREVA E, ABELIOVICH A. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 2003; **37**: 735–749.
- [111] STROUS GJ, GOVERS R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 1999; **112**: 1417–1423.
- [112] SUN I. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Therapy* 2003; **2**: 623–629.
- [113] SUZUKI Y, NAKABAYASHI Y, TAKAHASHI R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:8662–8667.
- [114] TANG Z, LI B, BHARADWAJ R, ZHU H, OZAKAN E, HAKALA K, DEISENHOFER J, YU H. APC2 cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 3839–3851.
- [115] THIEN CB, WALKER F, LANGDON WY. RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and down-regulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Mol Cell* 2001; **7**:355–365.
- [116] TOYOTA M, SASAKI Y, SATOH A, OGI K, KIKUCH T, SUZUKI H, MITA H, TANAKA N, ITOH F, ISSA JJ, JAIR K, SCHUEBEL KE, IMAI K, TOKINO T. Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2003; **100**: 7818–7823.
- [117] TYERS M, WILLEMS AR. One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science* 1999; **284**: 601–604.
- [118] TYRES M, JORGENSEN P. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Gen Dev* 2000; **10**: 54–64.
- [119] VANDEMARK AP, HILL CP. Structural basis of ubiquitylation. *Curr Opin Struct Biol* 2002; **12**: 822-830.
- [120] VERMA R, ARAVIND L, OANIA R, McDONALD WH, YATES JR. 3rd, KOONIN EV, DESHAIE RJ. Role of Rpn1 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; **298**: 549–552.
- [121] VEW PR. Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S- phase regulators. *J Cell Physiol* 2001; **187**:1–10.
- [122] VOGES D, ZWICKL P, BAUMEISTER W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999; **68**:1015–1068.
- [123] WATERMAN H, LEVKOWITZ G, ALROY I, YARDEN Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22151–22154.

- [124] WEBER JD, TAYLOR LJ, ROUSSEL MF, SHERR CJ, BAR-SAGI D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biol* 1999; **1**: 20–26.
- [125] WU K, CHEN A, PAN ZQ. Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. *J Biol Chem* 2000; **275**: 32317–32324.
- [126] WU K, YAMOA H, DOLIOS G, GAN-ERDENE T, TAN P, CHEN A, LEE CG, WIE N, WILKINSON KD, WANG R, PAN ZQ. DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J Biol Chem* 2003; **278**: 28882–28891.
- [127] XIA Y, PAO GM, CHEN H, VERMA IM., HUNTER T. Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. *J Biol Chem* 2003; **278**: 5255–5263.
- [128] XIRODIMAS DP, CHISHOLM J, DESTERRO JMS, LANE DP, HAY RT. P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)MDM2. *FEBS Lett* 2002; **528**: 207–211.
- [129] XIRODIMAS DP, STEPHEN CW, LANE DP. Compartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp Cell Res* 2001; **270**: 66–77.
- [130] YANG X, MENON S, LYKKE-ANDERSEN K, TSUGE T, XIAO D, WANG X, RODRIGUEZ-SUAREZ RJ, ZHANG H, WEI N. The COP9 signalosome inhibits p27^{kip1} degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cul1. *Curr Biol* 2002; **12**: 667–672.
- [131] YANG Y, FANG S, JENSEN JP, WEISSMAN AM, ASHWELL JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000; **288**: 874–877.
- [132] YAO T, COHEN RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 2002; **419**: 403–407.
- [133] YASUI K, ARII S, ZHAO C, IMOTO I, UEDA M, NAGAI H, EMI M, INAZAWA J. TFDPI, CULA4, and CDC16 identified as targets for amplification a 13q34 in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2002; **35**: 1476–1484.
- [134] YOKOUCHI M, KONDO T, HOUGHTON A, BARTKIEWICZ M, HORNE WC, ZHANG H, YOSHIMURA A, BARON R. Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31707–31712.
- [135] YOKOUCHI M, KONDO T, SANJAY A, HOUGHTON A, YOSHIMURA A, KOMIYA S, ZHANG H, BARON R. Src-catalyzed phosphorylation of c-Cbl leads to the interdependent ubiquitination of both proteins. *J Biol Chem* 2001; **276**: 35185–35193.
- [136] YU ZK, GEYER RK, MAKI CG. MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic P53. *Oncogene* 2000; **19**: 5892–5897.
- [137] ZHANG Y, CHUNG KK, HUANG H, DAWSON VL, DAWSON TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13354–13359.
- [138] ZHANG Y, XIONG Y. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ* 2001; **12**: 175–186.
- [139] ZHENG N, WANG P, JEFFREY PD, PAVLETICH NP. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 2000; **102**: 533–539.
- [140] ZHENG N, SCHULMAN BA, SONG L, MILLER JJ, JEFFREY PD, WANG P, CHU C, KOEPP DM., ELLEDGE SJ, PAGANO M, CONAWAY JW, HARPER JW, PAVLETICH NP. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box^{Skp2} SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 2002; **416**: 703–709.
- [141] ZHU Q, YAO J, WANI G, WANI AA. Mdm2 mutant defective in binding p300 promotes ubiquitination but not degradation of p53: evidence for the role of p300 in integrating ubiquitination and proteolysis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 29695–29701.
- [142] ZWICKL P, SEEMULLER E, KAPELARI B, BAUMEISTER W. The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Adv Protein Chem*. 2001; **59**: 87–222.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 24.03.2004 r.

Przyjęto: 30.03.2004 r.

Adres autora: Zakład Biochemii Komórki,

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN,

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail; b.grzelakowska@nencki.gov.pl

SPRAWOZDANIE ZARZĄDU FUNDACJI BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ ZA ROK 2003

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 8340344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl

W obecnym okresie sprawozdawczym Zarząd działał w składzie: Jerzy Kawiak – prezes, Maciej Zabel – sekretarz, Joanna Liwska – skarbnik, Barbara Bilińska i Jan Litwin – członkowie Zarządu. W skład **Rady Fundacji** wchodził: Zofia Osuchowska – przewodnicząca, członkowie: Tadeusz Cichocki, Aleksander Koj, Włodzimierz Korohoda, Andrzej Łukaszyk, Andrzej Myśliwski, Maria Olszewska, Aleksandra Stojalowska, Jan Steffen. Z żalem pożegnaliśmy prof. Antoniego Horsta i prof. Józefa Kałużę.

Zarząd pracował społecznie. W pracy Zarządu pomagały panie: Celina Adamczyk – księgowa, oraz Barbara Miks i Danuta Wasilewska w rozprawianiu zeszytów „Postępów Biologii Komórki”. Zarząd składa tym osobom serdeczne podziękowania.

1. DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA

Jest to główny zakres działania Zarządu Fundacji. Fundacja wspiera wydawanie czasopism „Folia Histochemica et Cytobiologica” oraz „Postępy Biologii Komórki”.

A. *Folia Histochemica et Cytobiologica*

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie odpowiadającej standardom międzynarodowym. Koedytoraми Redakcji są: Z. Darzynkiewicz, A. Hinek, M. Z. Ratajczak, J. P. Robinson. Wprowadzono zwyczaj częstego publikowania artykułów przeglądowych pisanych przez wybitnych specjalistów. Skład i druk czasopisma odbywa się w Krakowie.

Merytoryczną pieczę i decyzje o składzie Redaktorów „Folia” ma Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików. Również Towarzystwo od 1995 r. jest formalnym właścicielem czasopisma.

Wydawanie czasopisma odbywa się z finansową pomocą Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma.

Artykuły z „Folia” są indeksowane w: Medline, Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert., Current Content Impact Factor podniósł się z IF = 0,289 w roku 1998 do IF = 0,526 w roku 2002. Informacje na ten temat można uzyskać np. pod telefonem 022-660-7300 w Politechnice Warszawskiej bądź w Redakcji *Folia Histo- et Cytochemica*, tel. 48-012-4227027 ew. e-mail: mmlitwin@cyf-kr.edu.pl.

B. Postępy Biologii Komórki

Czasopismo ukazywało się regularnie. Okładka czasopisma, spis artykułów, informacje o redaktorach i czasopiśmie są w j. polskim i j.angielskim dostępne na stronie www.pbkom.pl. Oprócz informacji o czasopiśmie są tam bieżąco publikowane tytuły artykułów i ich streszczenia.

W dalszym ciągu wydawano suplementy. Suplement 21/ vol. 30 pod redakcją: M.Ratajczaka, Z.Osuchowskiej i J.Kawiaka miał tytuł „Komórki macierzyste”.

Merytoryczną pieczę nad „Postępami” ma od 30 lat Polskie Towarzystwo Anatomiczne oraz od 9 lat Polskie Towarzystwo Biologii Komórki. Tytuł własności czasopisma „Postępy Biologii Komórki” ma Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej. Wydawanie czasopisma odbywa się z finansową pomocą Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma. Skład czasopisma odbywał się w Spółce z o.o. „Wieś Jutra” w Warszawie. Firma „Script” wspomagała współpracę z drukarniami.

Artykuły z „Postępów” są indeksowane w: National Library of Medicine, Bethesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich’s International Periodicals Directory, Bibliotekę Narodową i Bibliotekę UJ.

2. Fundacja finansuje z własnych dochodów około 30% kosztów wydawania czasopism. Dochody Fundacji pochodziły ze sprzedaży czasopism, dofinansowania ze źródeł zewnętrznych oraz procentów bankowych. Fundacja bardzo oszczędnie gospodaruje finansami, na część etatu zatrudnia księgową, za niewielką odpłatnością organizuje prenumeratę i wysyłkę „Postępów”. Prace członków Zarządu i Rady Fundacji, redaktorów oraz recenzentów wykonywane są społecznie. Stan konta na dzień 31.12.2003 jest dodatni.

Prezes Fundacji:

Jerzy Kawiak

Sekretarz:

Maciej Zabel

Warszawa, grudzień 2003.

KOMUNIKATY

W imieniu Komitetu Organizacyjnego Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej nt.

„Metabolizm leków i antybiotyków”

Mam zaszczyt i ogromną przyjemność powiadomić Państwa, że w pierwszej dekadzie września 2004 roku w Ustroniu pragniemy zorganizować kolejne nasze spotkanie naukowe.

Aby umożliwić Państwu szybki i bezpośredni kontakt z Komitetem Organizacyjnym, uruchamiamy na potrzeby Konferencji stronę internetową, na której będą umieszczane wszystkie ważne i aktualne dane dotyczące Zjazdu:

WWW.metabolizm.slam.katowice.pl
e-mail: metabolizm@slam.katowice.pl

Tą drogą będziemy chcieli przyjmować od Państwa między innymi dane o rejestracji uczestników, streszczenia referatów i inne informacje. Strona ta będzie sukcesywnie aktualizowana i uzupełniana i dlatego prosimy o częste jej odwiedzenie.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
Dr Andrzej Plewka

IV Konferencja Sekcji Endokrynologii Molekularnej Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego

odbędzie się 2–3 października 2004 r. w sali konferencyjnej Muzeum Archeologicznego w Poznaniu – Pałac Górków (ul. Wodna 27).

Program naukowy obejmuje wykłady plenarne i prezentacje prac oryginalnych z zakresu:

endokrynologii molekularnej (postępy w badaniach molekularno-genetycznych endokrynopatii – choroby tarczycy, przysadki, nadnerczy, przytarczyc, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, nowotwory gruczołów endokrynnych),

diagnostyki molekularnej,

terapii genowej i rekombinowanymi hormonami.

Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego
dr hab. med. Katarzyna Łącka

tel. (61) 8691323, kom. 604 90 50 86

fax (61) 8691682

e-mail: K_Lacka@wp.pl lub gradecka_kwbik@op.pl

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

Prosimy Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik dla Autorów w 2004 r.

	odbitki prac			barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2004 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 20124010531111000004409533.

Cena prenumeraty rocznika	na rok 2004	na rok 2005
dla instytucji (bibliotek)	wynosi 150 zł,	150 zł
dla odbiorców indywidualnych	40 zł.	50 zł

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2004

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 20124010531111000004409533.

Price per year 25 dollars USA or 21 euro.

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 odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku 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 druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 396) 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 zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] *Histone and Nucleohistones*. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64..

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i 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 błyszczącym 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 niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie 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 odbitki odpłatnie odsyłając korektę. 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. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.

Redakcja prosi także o dołączenie tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana, nie została wysłana do innej redakcji	<i>tak nie</i>	<i>tak nie</i>
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	<i>tak nie</i>	<i>tak nie</i>
Jest zgodna osoba, których informacja niepublikowane są zamieszczone w tekście		<i>tak nie</i>	<i>tak nie</i>

Odpowiadam za całość pracy opisanej w załączonym maszynopisie *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 – CONTENT

W tym Zeszyście	213
Wykaz recenzentów z t. 30 z roku 2003	214
Wspomnienie o Profesorze Józefie Kałuży 10.03.1929–26.07.2003	215
MOTYL T., GAJKOWSKA B, GÓRKA M., GODLEWSKI M. M., LAMPARSKA-PRZYBYSZ M.: Kinetyka oraz regulacja uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów komórek nowotworowych pod wpływem stymulacji apoptogennej Kinetics and regulation of Smac/DIABLO release from mitochondria of cancer cells exposed to apoptogenic stimulus	219
CHMURZYŃSKA A.: Transkrypcyjna regulacja adipogenezy Transcriptional regulation of adipogenesis	235
WOJDA U.: Terapia genowa komórek układu krwiotwórczego: rozwój strategii i wektorów Gene therapy of hematopoietic cells: development of strategies and vectors.	245
NOWAKOWSKA P., WOJCIECHOWSKI W., KOPCEWICZ J.: Kompleks sygnałny COP9 i jego rola w regulacji stabilności białek eukariotów The COP9 signalosome and its role in regulation protein stability in eukaryotes	259
MATULEWICZ Ł., PRZYBYSZEWSKI W. M.: Wpływ lipidów na aktywność polimeraz DNA Influence of lipids on DNA polymerases activity	277
ANTOSZ H.: Antygen CD34 i komórki CD34 pozytywne CD34 antigen and CD34-positive cells	285
LUBKA M., WOJDA A., WITT M.: Mikrojądra w komórkach człowieka – powstawanie, zawartość oraz wykorzystanie diagnostyczne i prognostyczne Micronuclei in human cells – formation, contents, diagnostic and prognostic application	299
ZIENKIEWICZ K., NIEDOJADŁO J.: Natura i funkcje ciał Cajala w świetle nowych badań Nature and functions of Cajal bodies in the light of new research	313
CYMERYS J., NIEMIAŁTOWSKI M.: Białka szoku cieplnego – Molekularne perpetuum mobile Heat shock proteins – molecular perpetuum mobile	331
KUTA E., ROJEK J. Imprinting genomowy u roślin Genomic imprinting in plants	353
GRZELAKOWSKA-SZTABERT B.: Oligo- i monomeryczne ligazy ubikwitynowe E3 z domeną <i>ring finger</i> – budowa i działanie Oligo- and monomeric ubiquitin ligases e3 with ring finger domain – structure and function	373
Sprawozdanie Zarządu fundacji za rok 2003	393
Komunikat oraz Wskazówki dla Autorów i warunki prenumeraty	395