

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 32, ISSUE 3/2005  
(393–590)

Postępy  
Biologii  
Komórki

Advances  
in Cell  
Biology

[www.pbkom.pl](http://www.pbkom.pl)

[rcin.org.pl](http://rcin.org.pl)

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:

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*

Janusz KUBRAKIEWICZ – biologia rozwoju, embriologia, różnicowanie komórek, cytoszkielet – developmental biology, embryology, cell differentiation, cytoskeleton – *Instytut Zoologiczny UW, 50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21*

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

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

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybridocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. 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, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

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

Ark. wyd. 17,0. Ark. druk. 12,5. Podpisano do druku w lipcu, a druk ukończono we wrześniu 2005 r.

## W tym Zeszycie

Białka dynamino-podobne występują u zwierząt, jak i u roślin. Biorą one udział w tworzeniu przegrody pierwotnej podczas cytokinezy, w procesie endocytozy oraz stanowią elementy podziału mitochondriów i chloroplastów. Problemy te są omówione szeroko na stronie 423.

Proteasomową degradację białek omówiono na stronie 435. Przedstawiono tam też budowę proteasomów 20S, 26S i aktywatora PA700, omówiono rolę immunoproteasomów w odpowiedzi immunologicznej oraz biogenezę tych organelli.

Roślinne transglutaminazy omówiono na stronie 463. Enzymy te wydają się być związane z procesami wzrostowymi i rozwojowymi roślin oraz odpowiedzią rośliny na czynniki stresowe.

W niszczeniu przeszczepu uczestniczą komórki efektorowe, w tym alloreaktywne limfocyty CD8. Wykazują one ekspresję FasL, indukując apoptozę Fas-pozytywnych komórek przeszczepu. Apoptoza alloreaktywnych limfocytów wydaje się niezbędna dla uzyskania tolerancji alloprzeszczepu. Terapeutyczne strategie indukcji tolerancji przeszczepu mogą być osiągnięte przez delecję alloreaktywnych limfocytów, modyfikację ekspresji FasL, blokadę kostymulacji np. przeciwciałami anti-CD28 stosowanymi w obecności IFN $\gamma$ . Więcej o tym jest na stronie 511.





## CHARAKTERYSTYKA STRUKTURALNA, BIOCHEMICZNA I FUNKCJONALNA MIĘŚNI ZEWNĘTRZNYCH GAŁKI OCZNEJ

STRUCTURAL, BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTIC  
OF THE EXTRAOCULAR MUSCLES

Joanna MAJERCZAK<sup>1</sup>, Jerzy Andrzej ŻOŁĄDŹ<sup>1</sup>, Krzysztof DUDA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Mięśni, Instytut Fizjologii Człowieka, Akademia Wychowania  
Fizycznego i <sup>2</sup>Klinika Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii  
im. Marii Curie-Skłodowskiej w Krakowie

**Streszczenie:** Mięśnie zewnętrzne gałki ocznej cechuje znakomita kontrola nerwowo-mięśniowa (jeden akson unerwia około 7 włókien mięśniowych) umożliwiającą wysoką precyzję ruchów gałek ocznych i prawidłowe obuoczne widzenie. Mięśnie zewnątrzgałkowe w porównaniu z mięśniami szkieletowymi charakteryzują się m.in. znacznie wyższą maksymalną prędkością skracania oraz istotnie niższą wielkością maksymalnej siły izometrycznej, wyrażonej na jednostkę przekroju poprzecznego mięśnia. Oprócz różnic funkcjonalnych występujących między mięśniami zewnątrzgałkowymi a mięśniami szkieletowymi stwierdza się również różnice w budowie molekularnej m.in. wyższą procentową zawartość szybkich izoform łańcuchów ciężkich miozyny typu II, obecność specyficznych izoform łańcuchów ciężkich miozyny, tj. zewnątrzgałkową (MyHC eom), czy toniczną (MyHC-sto), stałą obecność izoform rozwojowych (MyHC-emb i MyHC-pn), większą gęstość pomp wapniowych w siateczce sarkoplazmatycznej (SERCA). Z nieznanymi powodami mięśnie zewnątrzgałkowe nie są podatne na występujące w mięśniach szkieletowych takie choroby, jak: dystrofia mięśniowa Duchenne'a czy Beckera, natomiast wykazują one szczególną podatność na inne choroby, tj. miopatie oczne, które nie obejmują mięśni szkieletowych. Przyczyny różnic w podatności na choroby mięśniowe między mięśniami szkieletowymi a mięśniami zewnątrzgałkowymi nie są w pełni poznane. Mogą one wynikać z odmiennego pochodzenia tych mięśni. Mięśnie zewnątrzgałkowe wywodzą się bowiem z niesegmentowanej mezodermy głowowej, podczas gdy mięśnie szkieletowe z mezodermy segmentowanej.

**Słowa kluczowe:** mięśnie szkieletowe, mięśnie zewnątrzgałkowe, ciężkie łańcuchy miozyny.

**Summary:** Extraocular muscles are characterized by excellent neuromuscular control (one axon innervates about only 7 muscle fibres) which provides them high precision of eye movements and normal, binocular vision. In comparison to skeletal muscles extraocular, muscles are characterized by higher

maximal shortening velocity and lower maximal isometric force, expressed by amount of force generated per cross sectional surface area unit. Besides of functional differences occurring between extraocular and skeletal muscles, molecular differences are present such as higher proportion of fast myosin heavy chain isoforms, specific myosin heavy chain isoforms: extraocular (MyHC-eom) and tonic myosin heavy chain isoforms (MyHC-sto), continuous expression of developmental isoforms (MyHC-emb i MyHC-pn), higher density of sarcoplasmic reticulum calcium ion pumps (SERCA) in extraocular muscle fibres. It is not clear why extraocular muscles, in contrary to skeletal muscles are preferentially spared in muscles diseases such as Duchenne's or Becker muscular dystrophies and are preferentially susceptible to other diseases such as ocular myopathies. The causes of the differences in susceptibility to muscle diseases between skeletal and extraocular muscles remain unclear. They might be due to different ontogeny of this group of muscles. Extraocular muscles arise from unsegmented head mesoderm whereas skeletal muscles arise from segmented mesoderm.

*Key words:* skeletal muscles, extraocular muscles, myosin heavy chain isoforms.

*Wykaz stosowanych skrótów:* **MyHC** (myosin heavy chain) – łańcuch ciężki miozyny; **MyLC** (myosin light chain) – łańcuch lekki miozyny; **ELC** (essential light chain) – łańcuch lekki istotny; **RLC** (regulatory light chain) – łańcuch lekki regulujący; **SERCA** (Sarcoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$  ATP-ase) –  $Ca^{2+}$ -zależna ATP-aza siateczki sarkoplazmatycznej.

## I. WSTĘP

Ruchomość gałki ocznej jest warunkowana pracą mięśni zewnątrzgałkowych, do których zaliczamy dwie pary mięśni prostych (*m. rectus superior et inferior, m. rectus medialis et lateralis*) oraz jedną parę mięśni skośnych (*m. obliquus superior et inferior*). Mięśnie zewnątrzgałkowe umożliwiają wykonywanie przez gałkę oczną ruchów zarówno dowolnych, jak i odruchowych, a sprawne ich funkcjonowanie jest jednym z czynników warunkujących prawidłowe obuoczne widzenie [16, 32, 46, 70].

Mięśnie zewnątrzgałkowe, chociaż są to mięśnie poprzecznie prążkowane (podobnie jak mięśnie szkieletowe) [27, 77], cechują się wyższymi prędkościami skracania i niższymi wielkościami generowanej siły w porównaniu z mięśniami szkieletowymi [58]. Prawdopodobnie jedną z przyczyn odmienności mięśni zewnątrzgałkowych jest ich pochodzenie. W przeciwieństwie do mięśni szkieletowych tułowia i kończyn pochodzących z mezodermy segmentowanej, mięśnie zewnątrzgałkowe filogenetycznie wywodzą się z niesegmentowanej mezodermy głowowej [40].

Pochodzenie, odmiennosc czynników transkrypcyjnych na etapie różnicowania, prawdopodobnie wywierają wpływ na specyficzną budowę mięśni zewnątrzgałkowych, tj. niski wskaźnik unerwienia (tzn. mała liczba włókien mięśniowych unerwionych przez jeden akson), rodzaj unerwienia i różnorodność izoform łańcuchów ciężkich miozyny [17, 21, 46].

## II. BIAŁKA MIĘŚNIOWE I ICH ZNACZENIE FUNKCJONALNE

Własności mechaniczne mięśni szkieletowych charakteryzuje m.in. maksymalna prędkość skracania, maksymalna siła izometryczna, moc maksymalna oraz zdolność utrzymania mocy maksymalnej [78]. Wielkość wymienionych parametrów zależy



głównie od składu włókien mięśniowych, a podstawowym czynnikiem determinującym właściwości funkcjonalne włókien mięśniowych są łańcuchy ciężkie miozyny (MyHC) [33]. Doświadczalnie wykazano, że łańcuch ciężki miozyny, a ściślej subfragment S1 (tzw. główka miozyny), odpowiedzialny jest w cząsteczce miozyny za przekształcanie energii chemicznej pochodzącej z reakcji hydrolizy ATP w pracę mechaniczną, tj. przesunięcie filamentów miozyny względem filamentów aktyny [64].

Związek pomiędzy kinetyką reakcji hydrolizy ATP a mechaniką współdziałania miozyny z aktyną nie jest w pełni poznany. Przyjmuje się, że siła włókna mięśniowego, tj. miocytu, zależy od siły wytwarzanej przez pojedyncze połączenie aktomiozynowe oraz od stosunku czasu trwania fazy cyklu mostków, w którym miozyna jest silnie połączona z aktyną, do czasu trwania całego cyklu aktomiozynowego (ang. *duty ratio*). Maksymalna prędkość skracania włókna mięśniowego jest wynikiem długości jednostkowego przesunięcia aktyny względem miozyny (ang. *step size*) i szybkości cyklu aktomiozynowego [75]. Etapem odpowiedzialnym bezpośrednio za generowanie siły na poziomie pojedynczego połączenia aktomiozynowego jest uwolnienie ortofosforanu, któremu towarzyszy przejście od słabego do silnego stanu wiązania główek miozyny z aktyną [13, 64]. Prawdopodobnie o maksymalnej prędkości przesunięcia aktyny wobec miozyny decyduje szybkość uwalniania ADP z kompleksu aktomiozynowego [73].

Szybkość cyklu reakcji hydrolizy ATP (aktywność ATP-azowa), zależna od rodzaju łańcucha ciężkiego miozyny, pozostaje w ścisłym związku m.in. z maksymalną prędkością skracania oraz maksymalną mocą włókna mięśniowego [3, 22].

Istotny wpływ na prędkość skracania i siłę wytwarzaną przez włókno mięśniowe mają również łańcuchy lekkie miozyny (MyLC) [2, 15]. Jak wykazano, brak lekkich łańcuchów w cząsteczce miozyny powoduje zmniejszenie prędkości przesuwania filamentów aktynowych względem immobilizowanej miozyny, bez znaczącego wpływu na aktywność ATP-azową miozyny [36]. Z dwu par łańcuchów lekkich brak łańcuchów istotnych (ELC) w cząsteczce miozyny obniża siłę izometryczną włókna mięśniowego o około 50%, natomiast brak łańcuchów regulujących (RLC) nie wywiera wpływu na wielkość tej siły [69].

Włókna mięśniowe, w których występują łańcuchy ciężkie miozyny typu szybkiego, wykazują wyższe wartości maksymalnej prędkości skracania, maksymalnej mocy oraz większe zużycie ATP w stosunku do włókien, w których stwierdza się ekspresję łańcuchów ciężkich miozyny typu wolnego [3, 22]. Co ciekawe, w badaniach na poziomie pojedynczego połączenia aktomiozynowego wykazano, że nie ma różnicy w wielkości jednostkowego przesunięcia (5–15 nm) oraz jednostkowej wartości siły (2–10 pN) między miozyną szybką a miozyną wolną [42, 63, 65]. Obserwowane różnice między tymi miozynami wynikają prawdopodobnie z różnic w kinetyce reakcji cyklu aktomiozynowego [74]. Wykazano istotnie, że zarówno czas trwania jednostkowego przesunięcia, jak i czas trwania fazy cyklu mostków, w którym główka miozyny jest silnie związana z aktyną, są o około 40% krótsze dla miozyny o charakterze szybkim niż w przypadku miozyny wolnej [42, 65]. Krótszy czas jednostkowego przesunięcia w przypadku miozyny szybkiej przy tej samej wartości pojedynczego kroku prowadzi do wyższej prędkości skracania niż w przypadku miozyny wolnej. Z kolei dłuższy, w

przypadku miozyny wolnej, czas trwania fazy cyklu mostków, w którym miozyna jest silnie połączona z aktyną wpływa na wyższą średnią wartość siły wytworzonej przez miozynę wolną w porównaniu z miozyną szybką [42, 65].

Oprócz szybkości narastania siły ważną funkcjonalnie właściwością jest szybkość relaksacji mięśnia, determinowana przez szybkość odłączania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z troponiny C i wypompowywanie jonów wapnia z cytoplazmy przez  $\text{Ca}^{2+}$  zależne ATP-azy zlokalizowane w siateczce sarkoplazmatycznej (tzw. SERCA, ang. *Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ases*) [14, 68]. Włókna mięśniowe, w których występuje ekspresja łańcuchów ciężkich miozyny typu szybkiego, wykazują wyższą zawartość siateczki sarkoplazmatycznej, wyższą zawartość pomp wapniowych w siateczce sarkoplazmatycznej (SERCA) oraz wyższą zawartość parwalbuminy (białko cytoplazmatyczne wiążące jony  $\text{Ca}^{2+}$ ) w porównaniu z włóknami mięśniowymi wolnokurczliwymi, co wpływa na wyższe tempo relaksacji włókien szybkokurczliwych w porównaniu z wolnokurczliwymi [8, 50].

### III. IZOFORMY ŁAŃCUCHÓW CIĘŻKICH MIOZINY W MIĘŚNIACH PRAŻKOWANYCH CZŁOWIEKA

W miocytach mięśni poprzecznie prążkowanych występują różne izoformy łańcuchów ciężkich miozyny (MyHC) (tab. 1) oraz izoformy łańcuchów lekkich miozyny (MyLC), które są w większości produktami różnych genów albo powstają w drodze alternatywnego wycinania intronów z jednego genu [3, 60].

W genomie ludzkim zidentyfikowano dziesięć genów kodujących łańcuchy ciężkie miozyny mięśni poprzecznie prążkowanych [48, 58, 61, 72]. Z tego sześć genów zlokalizowanych w obrębie chromosomu 17: gen embrionalny (MyHC-emb), MyHC-IIa, MyHC-IIx, MyHC-IIb, gen okołourodzeniowy (MyHC-pn), gen zewnętrzzałkowy (MyHC-eom), dwa geny zlokalizowane w obrębie chromosomu 14: gen MyHC- $\alpha$  oraz MyHC- $\beta$  (MyHC-I). Prawdopodobnie w obrębie chromosomu 7 zlokalizowany jest gen kodujący izoformę MyHC-IIM, zaś w obrębie chromosomu 20 gen, który prawdopodobnie koduje wolną, toniczną izoformę łańcuchów ciężkich miozyny MyHC-sto [3, 58].

Ekspresja poszczególnych izoform łańcuchów ciężkich miozyny w komórce mięśniowej jest tkankowo specyficzna i tylko nieliczne izoformy są wspólne dla mięśni różnych typów [39]. Zmiana poziomu ekspresji genów we w pełni zróżnicowanym mięśniu zachodzić może w następstwie zmiany stężenia hormonów [25, 44], zmian obciążeń mechanicznych [20] oraz zmian związanych z unerwieniem [38, 44, 45]. W komórkach mięśni szkieletowych za tkankowo specyficzną ekspresję izoform łańcuchów ciężkich miozyny są odpowiedzialne białka z rodziny MyoD (MyoD, miogenina, myf5, Myf6) [18].

W mięśniach szkieletowych ekspresja genów MyHC-IIa, MyHC-IIx występuje w szybkich włóknach mięśniowych. We włóknach szybkich człowieka nie wykryto dotąd izoformy MyHC-IIb, mimo obecności takiego genu [3]. Ekspresja genów MyHC-emb i MyHC-pn związana jest z rozwojem mięśni oraz ich regeneracją [56, 59]. Gen MyHC-eom koduje super szybką izoformę MyHC obecną w mięśniach zewnętrzzałkowych



TABELA 1. Izoformy łańcuchów ciężkich miozyny (MyHC) oraz ich występowanie w mięśniach poprzecznie prążkowanych człowieka (na podstawie [3, 60])

Izoforma MyHC	Występowanie (rodzaj włókien mięśniowych)
MyHC-emb	włókna mięśniowe niedojrzałe (niezróżnicowane), włókna mięśniowe regenerujące, wrzeciona nerwowo-mięśniowe (włókna intrafuzalne), włókna mięśniowe mięśni zewnątrzgałkowych
MyHC-pn	włókna mięśniowe niedojrzałe (niezróżnicowane), włókna mięśniowe regenerujące, wrzeciona nerwowo-mięśniowe (włókna intrafuzalne), włókna mięśniowe mięśni zewnątrzgałkowych oraz mięśni żwaczy
MyHC-β (MyHC-I)	włókna mięśniowe mięśniówki komór serca, włókna mięśniowe wolnokurczliwe
MyHC-α	włókna mięśniowe mięśniówki przedsionków serca, wrzeciona nerwowo-mięśniowe (włókna intrafuzalne), włókna mięśniowe mięśni zewnątrzgałkowych oraz mięśni żwaczy
MyHC-IIa	włókna mięśniowe szybko kurczliwe
MyHC-IIx	włókna mięśniowe szybko kurczliwe
MyHC-IIb	izoforma dotąd niezidentyfikowana w mięśniach poprzecznie prążkowanych człowieka pomimo obecności genu MyHC-IIb, u ssaków występuje we włóknach mięśniowych szybko kurczliwych
MyHC-eom	włókna mięśniowe mięśni zewnątrzgałkowych, włókna mięśniowe mięśnia tarczowo-nalewkowego krtani
MyHC-IIIM	izoforma dotąd nie zidentyfikowana w mięśniach poprzecznie prążkowanych człowieka, pomimo obecności genu MyHC-IIIM, u ssaków występuje we włóknach mięśniowych mięśni żwaczy
MyHC-sto	włókna mięśniowe mięśni zewnątrzgałkowych, włókna mięśniowe mięśnia tarczowo-nalewkowego, wrzeciona nerwowo-mięśniowe (włókna intrafuzalne)

oraz w mięśniu tarczowo-nalewkowym krtani (*m. thyroarytenoideus*) [57, 58]. Ekspresja genu MyHC-β (MyHC-I) zachodzi we włóknach mięśniowych wolnych mięśni szkieletowych oraz we włóknach mięśniowych komór serca, z kolei gen MyHC-α koduje izoformę MyHC występującą w mięśniówce przedsionków serca [48, 60, 72]. Izoforma MyHC-sto występuje we włóknach mięśniowych intrafuzalnych [3].

#### IV. UNERWIENIE I TYPY WŁÓKIEN MIĘŚNIOWYCH W MIĘŚNIACH ZEWNĄTRZGAŁKOWYCH

W warunkach fizjologicznych ruchy gałek ocznych są skojarzone. Zsynchronizowany ruch gałek ocznych ma na celu umieszczenie obrazu przedmiotu obserwowanego w obszarze najlepszego widzenia w siatkówce, tj. w plamce żółtej. W prawidłowych

warunkach obraz przedmiotu, na który patrzymy, powstaje w siatkówkach obu oczu, a następnie w korze wzrokowej tworzy się pojedyncze wrażenie wzrokowe [41].

Synchroniczne, obuoczne ruchy gałek ocznych w tym samym kierunku, zwane zwrotami mogą mieć charakter wolnych ruchów wodzących za poruszającym się przedmiotem, jak i szybkich ruchów sakadowych, związanych ze zmianą przedmiotu zainteresowania w polu widzenia. Ponadto gałki oczne wykonują ruchy zbieżne i rozbieżne (wergencje) w celu utrzymania obuocznego widzenia. Zarówno zwroty, jak i wergencje mogą mieć charakter dowolny bądź odruchowy. Typowymi ruchami odruchowymi gałek ocznych są ruchy posturalne (w odpowiedzi na zmianę pozycji ciała) oraz ruchy optokinetyczne, do których zalicza się odruch fiksacji (ma na celu utrzymanie obrazu przedmiotu obserwowanego w miejscu najlepszego widzenia, tj. w plamce żółtej), odruch konwergencji (odruch, dzięki któremu następuje obuoczna fiksacja oglądanego przedmiotu) oraz odruch fuzji (odruch, dzięki któremu powstaje pojedyncze wrażenie wzrokowe w korze wzrokowej) [16, 32, 70].

Centralna, korowa reprezentacja dowolnych ruchów oczu znajduje się w płacie czołowym, w płacie ciemieniowym oraz w zakręcie obręczy [43].

Motoneuron okoruchowy obejmujący jądra ruchowe nerwów czaszkowych: III, IV i VI stanowi wspólną końcową drogę kontroli ruchów oczu. Częstotliwość wyładowań motoneuronu okoruchowego zależy od pozycji oczu i w pozycji pierwszorzędowej (przy patrzeniu na wprost) wynosi około 100 wyładowań na sekundę, a w czasie ruchów sakadowych (najszybszych ruchów gałek ocznych), sięga do około 600 wyładowań na sekundę [49]. W odróżnieniu od motoneuronu okoruchowego częstotliwość wyładowań motoneuronów rdzenia kręgowego, zaopatrujących mięśnie szkieletowe wynosi od około 50 do 125 wyładowań na sekundę [46].

Niski wskaźnik unerwienia mięśni wewnątrzgałkowych daje możliwość precyzyjnego kontrolowania narastania siły m.in. w czasie fiksacji gałki ocznej [21, 46].

W mięśniach zewnętrznych gałki ocznej można wyróżnić dwie warstwy: dobrze unaczynioną warstwę oczodołową, zbudowaną głównie z włókien mięśniowych wolnokurczliwych oraz warstwę przylegającą do gałki ocznej, słabiej unaczynioną, w której przeważają włókna szybko kurczliwe [71].

Większość (około 80%) włókien mięśniowych mięśni zewnątrzgałkowych to typowe włókna fazowe o pojedynczym połączeniu nerwowo-mięśniowym w postaci płytki motorycznej (zakończenie typu *en plaque*) i odpowiadających na bodziec skurczem pojedynczym [46, 71]. Poza włóknami fazowymi w mięśniach zewnątrzgałkowych występują nietypowe dla mięśni tułowia i kończyn włókna o unerwieniu typu *en grappe* (około 20%), w których połączenie nerwowo-mięśniowe nie jest ograniczone do jednego miejsca, ale włókno mięśniowe styka się z wieloma zakończeniami nerwowymi na swojej powierzchni [24]. Włókna o unerwieniu *en grappe* w warstwie gałkowej charakteryzują się zdolnością do odpowiedzi na pobudzenie skurczem o wydłużonym czasie trwania i, jak stwierdzono, oprócz MyHC I wykazują ekspresję wolnej, tonicznej izoformy MyHC-sto [28, 46]. W mięśniach szkieletowych człowieka włókna o unerwieniu *en grappe* nie występują [46].



## V. IZOFORMY MyHC W MIĘŚNIACH ZEWNĄTRZGAŁKOWYCH CZŁOWIEKA

W zróżnicowanych mięśniach zewnątrzgałkowych człowieka wykazano obecność wielu izoform ciężkich łańcuchów miozyny: MyHC- $\beta$  (MyHC-I), MyHC- $\alpha$ , MyHC-sto, MyHC-IIa, MyHC-eom, MyHC-emb, MyHC-pn [28, 60].

Dominującą izoformą włókien mięśniowych mięśni zewnątrzgałkowych obu warstw u człowieka jest izoforma szybka łańcuchów ciężkich miozyny typ IIa (MyHC-IIa), występująca w około 60% włókien [28, 71]. „Super” szybka specyficzna izoforma MyHC-eom występuje głównie w warstwie bezpośrednio przylegającej do gałki i stanowi około 25% całkowitej ilości MyHC [28]. Ekspresja MyHC-eom jest tkankowo specyficzna ograniczona do mięśni twarzoczaszki [3, 26, 37, 57, 60]. Miozynę o podobnej ruchliwości elektroforetycznej (zwaną przez niektórych autorów MyHC IIL) stwierdzono we włóknach mięśniowych mięśnia tarczowo-nalewkowego krtani zarówno w jego części wewnętrznej związanej z fonacją, jak i zewnętrznej związanej z odruchem krtaniowym [12, 37, 61, 76]. Podobnie jak w mięśniach zewnątrzgałkowych obecność „super” szybkiej miozyny w mięśniu tarczowo-nalewkowym wiąże się z niskimi wielkościami maksymalnej siły izometrycznej rozwijanej przez ten mięsień i wysoką maksymalną prędkością skracania włókien mięśniowych [12].

Wolna, toniczna izoforma łańcuchów ciężkich miozyny (MyHC-sto) jest charakterystyczna dla mięśni szkieletowych m.in. gadów i ptaków [24]. Występuje ona we włóknach o unerwieniu typu *en grappe* zwanych tonicznymi, o niskim zużyciu energii, które umożliwiają utrzymywanie części ciała w ustalonej pozycji przez dłuższy czas [15]. W mięśniach zewnątrzgałkowych człowieka izoforma toniczna nie jest jedyną izoformą łańcuchów ciężkich miozyny występującą we włóknach o unerwieniu typu *en grappe*. Większość wolnych włókien mięśni zewnątrzgałkowych ma charakter hybrydowy i obok tonicznej izoformy łańcuchów ciężkich miozyny wykazuje obecność MyHC- $\beta$  (MyHC-I), jak i MyHC- $\alpha$  [28, 31]. Jak dotąd w mięśniach zewnątrzgałkowych człowieka, podobnie jak w mięśniach szkieletowych nie wykazano obecności MyHC-IIb [28].

Poza wymienionymi powyżej izoformami łańcuchów ciężkich miozyny w części włókien mięśni zewnątrzgałkowych, głównie w warstwie oczodołowej, stwierdzono obecność izoform związanych z rozwojem mięśni (MyHC-emb oraz MyHC-pn), które we w pełni zróżnicowanych mięśniach szkieletowych nie występują, wyjątek stanowią regenerujące włókna mięśniowe [56, 60].

## VI. STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA SPECYFIKA MIĘŚNI ZEWNĄTRZGAŁKOWYCH

Mięśnie zewnątrzgałkowe, chociaż są to mięśnie poprzecznie prążkowane, strukturalnie i funkcjonalnie różnią się od mięśni tułowia i kończyn [40, 52, 58].

Obok typowych dla mięśni szkieletowych izoform łańcuchów ciężkich miozyny (tj. MyHC-I, MyHC-IIa) w zróżnicowanych mięśniach zewnątrzgałkowych występują

izoformy specyficzne, tj. MyHC-emb oraz MyHC-pn, które w mięśniach szkieletowych związane są z procesem rozwoju i regeneracji, izoforma toniczna MyHC-sto obecna we włóknach o unerwieniu typu *en grappe* oraz izoforma MyHC-eom (MyHC-eom/III), której ekspresja ograniczona jest do mięśni zewnątrzgałkowych i mięśnia tarczowo-nalewkowego krtani [26, 28].

Tkankowo specyficzna ekspresja izoform łańcuchów ciężkich miozyny w mięśniach zewnątrzgałkowych, a zwłaszcza izoformy MyHC-eom wiąże się prawdopodobnie z odmienną sekwencją czasową pojawiania się czynników transkrypcyjnych z rodziny MyoD (*myf5*, MyoD, miogenina, *Myf6*) [40, 58]. Ekspresja *myf5* i MyoD jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju mięśni – brak ekspresji obu tych genów we wczesnym okresie rozwoju prowadzi do braku mięśni szkieletowych [53]. O ile kolejność pojawiania się podstawowych czynników transkrypcyjnych z rodziny MyoD jest taka sama zarówno w mięśniach wywodzących się z mezodermy segmentowanej, jak i w pochodzących z mezodermy niesegmentowanej (tj. najpierw *myf5*, potem MyoD), to ich ekspresja w rozwijających się mięśniach pochodzących z mezodermy niesegmentowanej pojawia się później i trwa dłużej niż w mięśniach tułowia i kończyn. Stąd w rozwijających się mięśniach trzewioczaszki pochodzących z mezodermy niesegmentowanej dochodzi do opóźnienia w pojawieniu się miozyny w porównaniu z mięśniami szkieletowymi [40]. Ponadto jak wykazano w procesie miogenezy mięśni szkieletowych, istotną rolę w aktywacji MyoD oprócz czynnika transkrypcyjnego *myf5* odgrywa czynnik Pax3, podczas gdy w procesie miogenezy w obrębie mięśni trzewioczaszki, wywodzących się z mezodermy niesegmentowanej (np. mięśnie zewnątrzgałkowe) nie jest on konieczny. Brak genu *Pax3/myf5* u myszy wyłącza miogenezę w obrębie mięśni tułowia i kończyn, przy zachowanym procesie różnicowania się mięśni trzewioczaszki wywodzących się z mezodermy niesegmentowanej [66]. Przypuszcza się ponadto (przez analogię do regulacji procesu miogenezy u muszki owocowej), że specyficzna i ograniczona do mięśni trzewioczaszki ekspresja genu MyHC-eom może być związana z odmiennymi od MyoD czynnikami transkrypcyjnymi, tj. Dach2, Six1, Eya2, które u muszki owocowej odgrywają podstawową rolę zarówno w procesie miogenezy, w procesie rozwoju gałki ocznej, jak i w procesie rozwoju zdolności widzenia [4, 23].

Obecność wielu różnych izoform łańcuchów ciężkich miozyny zarówno o niskich (MyHC-sto), jak i wysokich wartościach aktywności ATP-azy miozynowej (MyHC-eom) umożliwia gałce ocznej wykonywanie różnych rodzajów ruchów, począwszy od wolnych ruchów wodzących, poprzez ruchy zbieżne i rozbieżne, ruchy posturalne, optokinetyczne, aż do najszybszych ruchów człowieka zwanych sakadami, związanych z szybką zmianą punktu fiksacji [16, 32]. Uważa się, że istotną rolę w tych ostatnich odgrywa „super” szybka izoforma łańcuchów ciężkich miozyny MyHC-eom, stanowiąca około 25% całkowitej ilości MyHC w mięśniach zewnątrzgałkowych [35].

Jednym z głównych czynników wpływających na regulację ekspresji genów łańcuchów ciężkich miozyny są czynniki mechaniczne [19, 20, 35]. Niewielkie i stałe zewnętrzne obciążenie, jakie w warunkach prawidłowych stanowi masa gałki ocznej (7–8 gramów), tłumaczy zarówno małe wartości maksymalnej siły izometrycznej rozwijanej przez te mięśnie, jak i większą maksymalną prędkość skracania w porównaniu z mięśniami szkieletowymi [9]. Doświadczalnie wykazano, że wartość maksymalnej



siły izometrycznej stanowi 30–50% wartości uzyskiwanych przez mięśnie kończyn (mięśnie kończyn: ok.  $0,3 \text{ N} \cdot \text{mm}^{-2}$ , mięśnie zewnątrzgałkowe: ok.  $0,1 \text{ N} \cdot \text{mm}^{-2}$ ), a maksymalna prędkość skracania mięśni zewnątrzgałkowych jest o około 40% wyższa od najszybszych mięśni kończyn [1, 3, 9, 11].

Mniejsza wartość siły generowanej przez mięśnie zewnątrzgałkowe wynikać może z niższych wartości siły rozwijanej przez pojedyncze połączenie aktomiozynowe, z krótszego czasu trwania fazy cyklu mostków, w którym główka miozyny jest silnie związana z aktyną, bądź też z niższej liczby główek miozyny związanych z aktyną w czasie generowania siły [22, 35, 51, 75]. Wysoka prędkość skracania mięśni zewnątrzgałkowych jest związana z większym tempem relaksacji, które jest odzwierciedleniem szybkości odłączania główek miozyny od aktyny [51].

W obrębie mięśni zewnątrzgałkowych więcej pracy mechanicznej związanej z poruszaniem gałką oczną wykonuje warstwa oczodołowa [46]. Stąd prawdopodobnie większa liczba włókien z ekspresją wolnych izoform łańcuchów ciężkich miozyny w obrębie warstwy oczodołowej w porównaniu z warstwą bezpośrednio przylegającą do gałki ocznej [71]. Ponadto w obrębie części dystalnej warstwy oczodołowej mięśni zewnątrzgałkowych stwierdza się obecność izoform MyHC-emb i MyHC-pn, których ekspresja w mięśniach szkieletowych jest ograniczona do procesu rozwoju i regeneracji [56, 59]. Ostatnio wykazano w warstwie oczodołowej zróżnicowanych mięśni zewnątrzgałkowych obecność komórek satelitarnych w stanie aktywnym, co potwierdzałoby tezę o ciągłym procesie przebudowy pewnej populacji włókien w odpowiedzi na mechaniczne rozciąganie [6, 34].

Należy podkreślić, że cechą charakterystyczną włókien mięśniowych mięśni zewnątrzgałkowych jest występowanie włókien hybrydowych, w których występuje więcej niż jedna izoforma łańcuchów ciężkich miozyny w obrębie włókna [31, 52, 71]. W typowych, zróżnicowanych mięśniach szkieletowych przeważają włókna, w których z reguły występuje ekspresja jednego z trzech rodzajów łańcucha ciężkiego miozyny (włókno typu I z ekspresją MyHC I; włókno typu IIA z ekspresją MyHC IIA; włókno typu IIX z ekspresją MyHC IIX) lub dwóch rodzajów łańcucha ciężkiego miozyny (włókno typu IIAX z ekspresją MyHC IIA i MyHC IIX) [55]. Zmiana w poziomie ekspresji łańcuchów ciężkich miozyny w zróżnicowanych włóknach mięśniowych zachodzi np. w wyniku zwiększenia lub redukcji obciążenia mechanicznego [19, 20], odnerwienia [59], zastosowania elektrycznej stymulacji [45] czy też zmian stężenia hormonów [25].

Duża częstotliwość wyładowań motoneuronu okoruchowego, niski wskaźnik unerwienia oraz różnorodność izoform łańcuchów ciężkich miozyny, jak i obecność licznych włókien hybrydowych pozwala na lepszą kontrolę narastania siły w mięśniach zewnątrzgałkowych w porównaniu z mięśniami szkieletowymi [46]. Ponadto obecność zarówno SERCA 1a, jak i SERCA 2a w przeważającej liczbie włókien mięśniowych (w przeciwieństwie do mięśni szkieletowych kończyn, gdzie SERCA 1a występuje w siateczce sarkoplazmatycznej włókien szybko kurczliwych, a SERCA 2a występuje w siateczce sarkoplazmatycznej włókien wolno kurczliwych) świadczyć może o konieczności zapewnienia wyjątkowo sprawnej regulacji tempa relaksacji mięśni zewnątrzgałkowych [29].

Mięśnie zewnątrzgałkowe nie są podatne na ogólnie mięśniowe procesy chorobowe, takie jak dystrofia Duchenne'a czy Beckera, natomiast wykazują one szczególną podatność na inne choroby, tj. miopatie oczne (pierwotna miopatia oczna, dystrofia gardłowo-oczna, zespół Kearnsa-Sayrego) [34, 37]. Jedną z możliwych przyczyn różnej podatności na choroby mięśni poprzecznie prążkowanych jest odmienne pochodzenie mięśni zewnątrzgałkowych (niesegmentowana mezoderma głowowa) i mięśni szkieletowych (mezoderma segmentowana) [40]. Pochodzenie mięśni zewnątrzgałkowych nie tłumaczy jednakże w pełni oporności mięśni zewnątrzgałkowych na dystrofinopatie, w tym na najczęściej występującą dystrofię Duchenne'a. Prawdopodobnie istotną rolę w oporności mięśni zewnątrzgałkowych na zmiany dystroficzne włókien mięśniowych odgrywa możliwość syntezy w miocytach mięśni zewnątrzgałkowych utrofiny, białka homologicznego do dystrofiny [47, 54]. We włóknach mięśni prążkowanych znacząca ekspresja utrofiny występuje w okresie płodowym oraz w procesie regeneracji włókien, podczas gdy w mięśniu w pełni zróżnicowanym stwierdza się niewielkie ilości tego białka w złączu mięśniowo-ścięgnistym oraz w złączu nerwowo-mięśniowym [54]. Uważa się, że w mięśniach zewnątrzgałkowych utrofina zastępuje dystrofinę w kompleksie dystrofinowo-glikoproteinowym (ang. *dystrophin-glycoprotein complex, DGC*), przejmując rolę dystrofiny w stabilizacji błony komórkowej miocytu w czasie cyklu skurczowo-rozkurczowego, co przeciwdziałać może zmianom patologicznym w miocytach [10, 47, 54].

Poszukiwanie przyczyn oporności mięśni zewnątrzgałkowych na dystrofinopatie obejmujące mięśnie szkieletowe może być pomocne w znalezieniu odpowiedniej terapii tych schorzeń [47].

## VII. UWAGI KOŃCOWE

Rodzina eukariotycznych białek miozyny obejmuje 18 klas białek zaangażowanych w różne formy ruchu komórki [67]. Wspólną cechą miozyn jest obecność jednego bądź dwóch identycznych łańcuchów ciężkich miozyny o masie ok. 110 do 250 kDa oraz jednego bądź więcej łańcuchów lekkich miozyny o masie ok. 15 do 20 kDa [67]. Prawdopodobnie miozyny konwencjonalne (klasa II) zdolne do tworzenia filamentów oraz niekonwencjonalne, monomeryczne miozyny (klasa I) stanowiły ewolucyjnie najwcześniejszą grupę miozyn [30, 67].

Filogenetycznie gen *MYH13*, kodujący „super” szybką izoformę MyHC-eom reprezentuje linię genów, które pojawiły się w rozwoju jeszcze przed genami związanymi z rozwojem mięśni (MyHC-emb i MyHC-pn) [5]. Prawdopodobnie ekspresja genu *MYH13* w mięśniach zewnątrzgałkowych jest włączona w szerszy program rozwojowy związany nie tylko z rozwojem mięśni zewnątrzgałkowych, ale również z rozwojem procesu widzenia [5].

Eksperymentalnie wykazano, że brak bodźców wzrokowych w ważnym, początkowym etapie rozwoju procesu widzenia prowadzi do istotnego spadku ekspresji tkankowo specyficznego genu kodującego super szybką izoformę MyHC-eom w mięśniach zewnątrzgałkowych [7]. Zatem rozwój mięśni zewnątrzgałkowych jest związany z rozwojem procesu widzenia, a zaburzenia procesu widzenia w początkowym etapie rozwoju prowadzą do zmian w poziomie ekspresji łańcuchów ciężkich miozyny w mięśniach zewnątrzgałkowych [7].



## LITERATURA

- [1] ASMUSSEN G, BECKERS-BLEUKX G, MARECHAL G. The force-velocity relation of the rabbit inferior oblique muscle; influence of temperature. *Pflugers Arch* 1994; **426**: 542–547.
- [2] BOTTINELLI R, BETTO R, SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *J Physiol* 1994; **478**: 341–349.
- [3] BOTTINELLI R, REGGIANI C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 2000; **73**: 195–262.
- [4] BRIGGS MM, SCHACHAT F. Early specialization of the superfast myosin in extraocular and laryngeal muscles. *J Exp Biol* 2000; **203**: 2485–2494.
- [5] BRIGGS MM, SCHACHAT F. The superfast extraocular myosin (MYH13) is localized to the innervation zone in both the global and orbital layers of rabbit extraocular muscle. *J Exp Biol* 2002; **205**: 3133–3142.
- [6] BRUECKNER JK, ITKIS O, PORTER JD. Spatial and temporal patterns of myosin heavy chain expression in developing rat extraocular muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1996; **17**: 297–312.
- [7] BRUECKNER JK, PORTER JD. Visual system maldevelopment disrupts extraocular muscle-specific myosin expression. *J Appl Physiol* 1998; **85**: 584–592.
- [8] CARROLL S, NICOTERA P, PETTE D. Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am J Physiol* 1999; **277**: C1122–C1129.
- [9] CLOSE RJ, LUFF AR. Dynamic properties of inferior rectus muscle of the rat. *J Physiol* 1974; **236**: 259–270.
- [10] COHN RD, CAMPBELL KP. Molecular basis muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000; **23**: 1456–1471.
- [11] COOPER S, ECCLES JC. The isometric responses of mammalian muscles. *J Physiol* 1930; **69**: 377–385.
- [12] D'ANTONA G, MEGIGHIAN A, BORTOLOTTI S, PELLEGRINO MA, RAGONA RM, STAFFIERI A, BOTTINELLI R, REGGIANI C. Contractile properties and myosin heavy chain isoform composition in single fibre of human laryngeal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 2002; **23**: 187–195.
- [13] DANTZIG JA, BARSOTTI RJ, MANZ S, SWEENEY HL, GOLDMAN YE. The ADP release step of the smooth muscle cross-bridge cycle is not directly associated with force generation. *Biophys J* 1999; **77**: 386–397.
- [14] DĄBROWSKA R. Molekularne mechanizmy zależnej od Ca<sup>2+</sup> regulacji skurczu różnych typów mięśni. *Post Biochem* 1996; **42**: 195–203.
- [15] DĄBROWSKA R, STĘPKOWSKI D. Wpływ łańcuchów lekkich miozyny na jej funkcjonowanie. *Post Biochem* 1997; **43**: 143–150.
- [16] ENDERLE JD. Neural control of saccades. *Prog Brain Res* 2002; **140**: 21–49.
- [17] GOLDBERG SJ, SHALL MS. Motor units of extraocular muscles: recent findings. *Prog Brain Res* 1999; **123**: 221–232.
- [18] GOLDHAMER DJ, FAERMAN A, SHANI M, EMERSON CP. Regulatory elements that control the lineage-specific expression of myoD. *Science* 1992; **256**: 538–542.
- [19] GOLDSPIK G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 1999; **194**: 323–334.
- [20] GOLDSPIK G. Gene expression in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 285–290.
- [21] HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I. Rola elektromiografii w diagnostyce chorób mięśni. [w] Hausmanowa-Petrusewicz I [red.] Choroby nerwowo-mięśniowe. Warszawa: Wydaw. Nauk. PWN 1999: 26–62.
- [22] HE Z-H, BOTTINELLI R, PELLEGRINO MA, FERENCZI MA, REGGIANI C. ATP consumption and efficiency of human single muscle fibers with different myosin isoform composition. *Biophys J* 2000; **79**: 945–961.
- [23] HEANUE TA, RESHEF R, DAVIS RJ, MARDON G, OLIVER G, TOMAREV S, LASSAR AB, TABIN CJ. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev* 1999; **13**: 3231–3243.
- [24] HESS A. Vertebrate slow muscle fibers. *Physiol Rev* 1970; **50**: 40–62.
- [25] JAKUBIEC-PUKA A, CIECHOMSKA I, MACKIEWICZ U, LANGFORD J, CHOMONTOWSKA H. Effect of thyroid hormone on the myosin heavy chain isoforms in slow and fast muscles of the rat. *Acta Biochim Pol* 1999; **46**: 823–835.
- [26] JUNG HH, LIEBER RL, RYAN AF. Quantification of myosin heavy chain mRNA in somatic and branchial arch muscles using competitive PCR. *Am J Physiol* 1998; **275**: C68–C74.

- [27] KILARSKI W, BIGAJ J. Organization and fine structure of extraocular muscles in *Carassius* and *Rana*. *Z Zellforsch* 1969; **94**: 194–204.
- [28] KJELLGREN D, THORNELL LE, ANDERSEN J, PEDROSA-DOMELLÖF F. Myosin heavy chain isoforms in human extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 1419–1425.
- [29] KJELLGREN D, RYAN M, OHLENDIECK K, THORNELL LE, PEDROSA-DOMELLÖF F. Sarco(endo)plasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPases (SERCA1 and -2) in human extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 5057–5062.
- [30] KORN ED. Coevolution of head, neck, and tail domains of myosin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **97**: 12559–12564.
- [31] KRANJC BS, SKETELJ J, D'ALBIS A, AMBROZ M, ERZEN I. Fibre types and myosin heavy chain expression in the ocular medial rectus muscle of the adult rat. *J Muscle Res Cell Motil* 2000; **21**: 753–761.
- [32] KRZYSTKOWA K, KUBATKO-ZIELIŃSKA A, PAJAŁKOWA J, NOWAK-BRYGOWA H. Mechanizm ruchów galek ocznych. [w] Widłak-Piernikowa T [red.] Choroba zezowa. Rozpoznawanie i leczenie. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1997: 53–65.
- [33] LARSSON L, MOSS RL. Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J Physiol* 1993; **472**: 595–614.
- [34] McLOON LK, WIRTSCHAFTER J. Activated satellite cells in extraocular muscles of normal adult monkeys and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 1927–1932.
- [35] LI ZB, ROSSMANITH GH, HOH JFY. Cross-bridge kinetics of rabbit single extraocular and limb muscle fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 3770–3774.
- [36] LOWEY S, WALLER GS, TRYBUS KM. Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speeds of shortening. *Nature* 1993; **365**: 454–456.
- [37] LUCAS CA, RUGHANI A, HOH JFY. Expression of extraocular myosin heavy chain in rabbit laryngeal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1995; **16**: 368–378.
- [38] MAJERCZAK J, DUDA K, ŻOŁĄDŹ JA. Wpływ unerwienia, czynników hormonalnych i mechanicznych na ekspresję izoform miozyny w mięśniach szkieletowych. *Folia Med Cracov* 2001; **XLII**: 89–104.
- [39] NIEZAŃSKI K. Regulacja ekspresji genów miozyny mięśniowych ssaków. *Post Biochem* 1999; **45**: 12–20.
- [40] NODEN DM, MARCUCIO R, BORYCKI AG, EMERSON CP. Differentiation of avian craniofacial muscles: I. Patterns of early regulatory gene expression and myosin heavy chain synthesis. *Dev Dyn* 1999; **216**: 96–112.
- [41] PALACZ O. Zmysł wzroku. [w] Traczyk WZ, Trzebski A. [red.] Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2001: 100–120.
- [42] PALMITER KA, TYSKA MJ, DUPUIS DE, ALPERT NR, WARSHAW DM. Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms. *J Physiol* 1999; **519**: 669–678.
- [43] PIERROT-DESEILLIGNY C, MILEA D, MÜRI RM. Eye movement control by the cerebral cortex. *Curr Opin Neurol* 2004; **17**: 17–25.
- [44] PETTE D, STARON RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 1997; **170**: 143–223.
- [45] PETTE D, VRBOVA G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* 1999; **22**: 666–677.
- [46] PORTER JD, BAKER RS, RAGUSA RJ, BRUECKNER JK. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. *Surv Ophthalmol* 1995; **39**: 451–484.
- [47] PORTER JD, MERRIAM AP, KHANNA S, ANDRADE FH, RICHMONDS CR, LEAHY P, CHENG G, KARATHANASIS P, ZHOU X, KUSNER LL, ADAMS ME, WILLEM M, MAYER U, KAMINSKI HJ. Constitutive properties, not molecular adaptations, mediate extraocular muscle sparing in dystrophic *mdx* mice. *FASEB J* 2003; **17**: 893–925.
- [48] REGGIANI C, BOTTINELLI R, STIENEN GJM. Sarcomeric Myosin Isoforms: Fine Tuning of a Molecular Motor. *News Physiol Sci* 2000; **15**: 26–33.
- [49] ROBINSON DA. Oculomotor unit behavior in the monkey. *J Neurophysiol* 1970; **33**: 393–403.
- [50] ROME LC, SYME DA, HOLLINGWORTH S, LINDSTEDT SL, BAYLOR SM. The whistle and the rattle: the design of sound producing muscles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8095–8100.
- [51] ROME LC, COOK C, SYME DA, CONNAUGHTON MA, ASHLEY-ROSS M, KLIMOV A, TIKUNOV B, GOLDMAN YE. Trading force for speed: why superfast crossbridge kinetics leads to superlow forces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **11**: 5826–5831.
- [52] RUBINSTEIN NA, HOH JFY. The distribution of myosin heavy chain isoforms among rat extraocular muscle fiber types. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 3391–3398.



- [53] RUDNICKI MA, SCHNEGELSBERG PN, STEAD RH, BRAUN T, ARNOLD HH, JAENISCH R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 1993; **75**: 1351–1359.
- [54] RYBAKOVA IN, PATEL JR, DAVIES KE, YURCHENKO PD, ERVASTI JM. Urophin binds laterally along actin filaments and can couple costameric actin with sarcolemma when overexpressed in dystrophin-deficient muscle. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 1512–1521.
- [55] SARGEANT AJ. Neuromuscular determinants of human performance. [w] Whipp BJ, Sargeant AJ [red.] Physiological determinants of exercise tolerance in humans. London: Portland Press 1999: 13–28.
- [56] SARTORE S, GORZA L, SCHIAFFINO S. Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle. *Nature* 1982; **298**: 294–296.
- [57] SARTORE S, MASCARELLO F, ROWLERSON A, GORZA L, AUSONI S, VIANELLO M, SCHIAFFINO S. Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1987; **8**: 161–172.
- [58] SCHACHAT F, BRIGGS MM. Phylogenetic implications of the superfast myosin in extraocular muscles. *J Exp Biol* 2002; **205**: 2189–2201.
- [59] SCHIAFFINO S, GORZA L, PITTON G, SAGGIN L, AUSONI S, SARTORE S, LOMO T. Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle. *Dev Biol* 1988; **127**: 1–11.
- [60] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; **76**: 371–423.
- [61] SCIOTE JJ, MORRIS TJ, HORTON MJ, BRANDON CA, ROSEN C. Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain variations in human laryngeal muscle fibers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; **111**: 120–127.
- [62] SHRAGER JB, DESJARDINS PR, BURKMAN JM, KONIG SK, STEWART DR, SU L, SHAH MC, BRICKLIN E, TEWARI M, HOFFMAN R, RICKELS MR, JULLIAN EH, RUBINSTEIN NA, STEDMAN HH. Human skeletal myosin heavy chain genes are tightly linked in the order embryonic-IIa-IIb/x-ILb-perinatal-extraocular. *J Muscle Res Cell Motil* 2000; **21**: 345–355.
- [63] SPUDICH JA. How molecular motors work. *Nature* 1994; **372**: 515–518.
- [64] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H. Molekularny mechanizm generacji siły (ruchu) przez aktomiozynę. *Post Biochem* 1999; **42**: 185–194.
- [65] SUGIURA S, KOBAYAKAWA N, FUJITA H, YAMASHITA H, MOMOMURA S, CHAEN S, OMATA M, SUGI H. Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation. *Circ Res* 1998; **82**: 1029–1034.
- [66] TAJBAKHS S, ROCANCOURT D, COSSU G, BUCKINGHAM M. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 1997; **89**: 127–138.
- [67] THOMPSON RF, LANGFORD GM. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec* 2002; **268**: 276–289.
- [68] TUPLING AR, GREEN HJ, ROY BD, GRANT S, OUYANG J. Paradoxical effects of prior activity on human sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase response to exercise. *J Appl Physiol* 2003; **95**: 138–144.
- [69] VanBUREN P, WALLER GS, HARRIS DE, TRYBUS KM, WARSHAW DM, LOWEY S. The essential light chain is required for full force production by skeletal muscle myosin. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 12403–12407.
- [70] VON NOORDEN GK, CAMPOS EC. Physiology of the ocular movement. [w] Lampert R [red.] Binocular Vision and Ocular Motility. St. Louis: Mosby 2002: 52–84.
- [71] WASICKY R, ZIYA-GHAZVINI F, BLUMER R, LUKAS JR, MAYR R. Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 980–990.
- [72] WEISS A, SCHIAFFINO S, LEINWAND LA. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *J Mol Biol* 1999; **290**: 61–75.
- [73] WEISS S, ROSSI R, PELLEGRINO MA, BOTTINELLI R, GEEVES MA. Differing ADP release rates from myosin heavy chain isoforms define the shortening velocity of skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 2001; **49**: 45902–45908.
- [74] WINEGRAD S. How actin-myosin interactions differ with different isoforms of myosin. *Circ Res* 1998; **82**: 1109–1110.
- [75] WOLEDGE RC, CURTIN NA, HOMSHER E. Crossbridge theories of muscle contraction. [w] Energetic aspects of muscle contraction. London: Academic Press 1985: 277–308.
- [76] WU YZ, CRUMLEY RL, ARMSTRONG WB, CAIOZZO VJ. New perspectives about human laryngeal muscle: single-fiber analyses and interspecies comparisons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; **126**: 857–864.

- [77] ZAWADOWSKA B. Ultrastructural characteristic of extrinsic eye muscles of the carp (*Cyprinus carpio* L.) and Pike (*Esox lucius* L.). *Z Mikrosk Anat Forsch* 1988; **102**: 796–810.
- [78] ŻOŁĄDŹ JA. Wydolność fizyczna człowieka. [w] Górski J [red.] Fizjologiczne podstawy wysiłku fizycznego. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2001: 456–522.

*Redaktor prowadzący – Wincenty Kilarski*

*Otrzymano: 05.01.2005 r.*

*Przyjęto: 14.04.2005 r.*

*Al. Jana Pawła II 78, 31-571 Kraków,*

*e-mail: wfmajerc@cyf-kr.edu.pl*



## TRANSLOKACJA BIAŁEK SYGNAŁOWYCH JAKO CZĘŚĆ SKŁADOWA ZJAWISKA OPÓŹNIONEJ, PONIEDOKRWIENNEJ ŚMIERCI NEURONÓW

TRANSLOCATION OF SIGNALING PROTEINS IS AN ELEMENT  
OF THE DELAYED POSTISCHEMIC NEURONAL CELL DEATH

Barbara ZABŁOCKA

Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego PAN

*Streszczenie:* Od wielu lat prowadzone są intensywne badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów śmierci neuronów w wyniku krótkotrwałego przerwania dopływu krwi do mózgu. Obecnie wydaje się, że istotnym elementem przekazywania sygnału ischemicznego jest przemieszczanie się pomiędzy przedziałami komórkowymi wielu białek, które w zależności od lokalizacji i współpartnerów mogą pełnić różne funkcje. Przejściowe niedokrwienie mózgu powoduje bardzo szybką translokację wielu kinaz białkowych (PKC, CamKII) do zagęszczeń postsynaptycznych, gdzie wydają się oddziaływać na rozprzestrzenianie się sygnału ischemicznego. W dłuższym czasie po niedokrwieniu we frakcji mitochondriów zwiększa się ilość kinazy JNK i proapoptotycznego białka Bad, a zmniejsza się ilość kinazy Raf-1. Również lokalizacja cytochromu c ulega dynamicznym zmianom w wyniku ischemii. Obok swojego tradycyjnego miejsca w mitochondriach, występuje on w poischemicznej cytoplazmie, gdzie może aktywować kompleks apoptosomu i kaskadę kaspaz. Coraz liczniejsze dane wskazują, że przejściowa ischemia mózgu inicjuje w niedokrwionych komórkach szybkie zmiany w wewnątrzkomórkowej lokalizacji, a tym samym funkcji wielu białek sygnałowych.

*Słowa kluczowe:* niedokrwienie mózgu, zagęszczenie postsynaptyczne, mitochondria, szlaki przekazywania sygnału, uszkodzenie mózgu, kinazy białkowe.

*Summary:* Neuronal degeneration following transient global cerebral ischaemia develops from complex series of pathophysiological events that evolve in time and intracellular space. During both, the early and delayed, postischemic stages translocation of proteins to postsynaptic density (PSD) and mitochondria are probably associated with recovery or cell death in vulnerable brain regions. Early after the insult a significant increase in the amount of CamKII and PKC isoforms is observed in PSD. Sustained changes in protein kinases content in PSD may cause persistent alteration in synaptic transmission. In the time course of reperfusion the activation state of key signaling molecules changes. Western blot analysis of phosphorylated forms of protein kinases revealed persistent activation of JNK, being limited mostly to vulnerable CA1 region. On the contrary, activation of ERK, although observed transiently

in both parts, was enhanced for a longer time in the abdominal, resistant part of hippocampus. Moreover, the amount of active JNK linked with mitochondria was significantly increased and preceded neuronal death in CA1. In parallel, the amount of pro-survival Raf-1 kinase decreased in mitochondria and proapoptotic Bad protein content was increased. Concomitantly, transient ischemia evokes biphasic cytochrome c release from mitochondria. Cytochrom c in cytoplasm may be involved in the activation of apoptosom, therefore cascade of caspases. Chasing a protein translocation in brain ischemia pathology this is a new research approach which might contribute to understand of the whole process and to search for a new points to prevent neuronal death.

*Key words:* brain ischemia, postsynaptic density, mitochondria, signal transduction pathways, neuronal degeneration, protein kinases.

## WSTĘP

Niedokrwienie mózgu występuje u jednej na 250 osób i jest trzecią w krajach rozwiniętych, a czwartą w Polsce przyczyną zgonów. Szansa wystąpienia udaru niedokrwiennego rośnie wraz z wiekiem i u osób po 65 roku życia dotyka około 5% populacji w tej grupy wiekowej. Już kilkuminutowe przerwanie krążenia krwi powoduje uszkodzenia mózgu wymagające rehabilitacji zmierzającej do przywrócenia choć części utraconych funkcji. Warunkiem znalezienia skutecznych metod zapobiegania występowaniu i rozwijaniu się poniedokrwiennej śmierci neuronów jest badanie mechanizmów tego procesu.

Całkowite i uogólnione niedokrwienie mózgu wywołuje nagłe załamanie homeostazy tkanki oraz charakterystyczny zespół ciężkich zaburzeń neurologicznych. W zależności od czasu trwania niedokrwienia, jak i towarzyszących mu zaburzeń systemowych ostre zmiany metaboliczne mogą cofnąć się całkowicie lub spowodować szybką śmierć organizmu. Pomędzy tymi skrajnymi reakcjami na niedokrwienie znajduje się całe spektrum trwałych uszkodzeń strukturalno-funkcjonalnych, znanych pod nazwą zespołu encefalopatii poniedokrwiennej. Bezpośrednie skutki ostrego niedoboru tlenu i glukozy, występujące w czasie zatrzymania krążenia mózgowego, prowadzą w ciągu kilkunastu minut do ustania funkcji mózgu, nieodwracalnych zmian strukturalnych i śmierci organizmu. Wydaje się, że mechanizm powstawania opóźnionych uszkodzeń poniedokrwienych, rozwijających się selektywnie tylko w niektórych, wyjątkowo wrażliwych strukturach mózgu, takich jak hipokamp, jest wysoce specyficzny i znacznie odbiegający od tego, co obserwuje się w ostrej fazie patologii niedokrwiennej. Uszkodzenia te powstają prawdopodobnie w wyniku rozwoju określonej sekwencji wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych indukowanych stresem niedokrwienym. Nasze ostatnie badania, jak i liczne doniesienia z piśmiennictwa wskazują, że szczególnie istotne w przekazywaniu sygnału prowadzącego do opóźnionej śmierci neuronów w ischemii mózgu są dynamicznie zmieniające się kompleksy białkowe w zagęszczeniach postsynaptycznych (PSD) i w mitochondriach. Translokacje białek sygnałowych do wyżej wspomnianych struktur prowadzą do i) rozprzestrzeniania bodźca w komórce, co może skutkować jej przeżyciem lub eliminacją oraz ii) do końcowych etapów śmierci neuronów we wrażliwych na krótkie niedokrwienie rejonach mózgu, którym towarzyszy wtórne załamanie energetyczne [49] oraz aktywacja szlaków sygnałowych charakterystycznych dla programu apoptozy [6].



Mechanizm(y) i związki pomiędzy zdarzeniami, indukującymi bądź towarzyszącymi poischemicznej, opóźnionej śmierci neuronów, nie są w pełni poznane i stanowią bezpośredni cel wielu badań podejmowanych w laboratoriach na całym świecie. Nadrzędnym celem prowadzonych prac jest stworzenie uporządkowanego opisu przekazywania sygnału w niedokrwionych komórkach, który może pomóc w znalezieniu nowych strategii leczniczych przeciwdziałających uszkodzeniom neuronów w ischemii mózgu.

## MODELE BADAWCZE

Przerwanie dopływu krwi do mózgu powoduje poważne zaburzenia metaboliczne, obserwowane w trakcie niedokrwienia i po przywróceniu krążenia. W modelu przejściowego, 5-minutowego niedokrwienia mózgu gerbilla mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) morfologiczne oznaki ubytku neuronów obserwowane są w sektorze CA1 hipokampów po 2–3 dniach reperfuzy [21,30]. Podobny skutek czasowego niedokrwienia mózgu obserwuje się również w innych modelach ischemii u szczura [32,41,51]. Zanik neuronów we wrażliwych rejonach mózgu ma wiele cech charakterystycznych dla programowanej śmierci komórek – apoptozy [14]. W modelach ischemii zarówno u szczura, jak i u gerbilla po upływie 7 dni od niedokrwienia większość (ponad 80%) neuronów wrażliwej okolicy CA1 hipokampa ginie, a złożony, wieloczynnikowy proces prowadzący do śmierci opisywany jest jako opóźniona, selektywna, poniedokrwienna śmierć neuronów [9,54].

## SYGNAŁ ISCHEMICZNY

Już w trakcie pierwszych minut trwania ischemii obserwowane jest gwałtowne zahamowanie aktywności elektrycznej mózgu [55] i postępujące wyczerpywanie się związków wysokoenergetycznych [16,34]. Dochodzi do spadku potencjału błonowego mitochondriów oraz uwalniania białek proapoptotycznych. Zaburzona zostaje homeostaza jonowa zarówno w komórkach nerwowych, jak i glejowych. Jednocześnie obserwowany jest nadmierny w stosunku do fizjologicznego wyrzut do przestrzeni międzykomórkowych pobudzających aminokwasów, głównie kwasu glutaminowego [39]. Kwas glutaminowy uwalniany jest z pęcherzyków synaptycznych, z zakończeń nerwowych oraz z tzw. puli metabolicznej aminokwasów. Komórki glejowe, na skutek wyczerpania się związków wysokoenergetycznych i odwrócenia działania transporterów aminokwasów [2,43], stają się dodatkowym źródłem m.in. pobudzających neurotransmiterów i zwiększają tym samym pobudzenie komórek nerwowych. Aktywacja receptorów kwasu glutaminowego i związany z tym znaczny wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie neuronów powodują aktywację wielu enzymów regulowanych jonami wapnia [59], co w konsekwencji prowadzi do uruchomienia szlaków sygnałowych prowadzących do przezwyciężenia patologicznego bodźca lub do eliminacji komórek w rejonach szczególnie wrażliwych. Jeśli niedokrwienie trwa stosunkowo krótko (do około 15 min), to po przywróceniu krążenia następuje odbudowa ATP, jednak niewydolny

łańcuch oddechowy jest źródłem wolnych rodników, które utleniają białka, lipidy i kwasy nukleinowe przyczyniając się do wtórnego uszkodzenia komórek.

## PSD I BIAŁKA PRZEKAZUJĄCE SYGNAŁ WAPNIOWY

Receptory neurotransmiterów umieszczone w błonie postsynaptycznej skupiają wokół siebie szereg białek przekazujących sygnały do wnętrza komórki. Podbłonowa, elektronogęsta struktura wielobiałkowa nosi nazwę „zagęszczenie postsynaptyczne” (PSD) [28]. Znajdujemy tu białka receptorowe dla kwasu glutaminowego (typu NMDA i mGluR), szkieletowe z rodzin MAGUK, GKAP, Shank i Homer, kinazy białkowe, neurofilamenty, mikrotubule, aktyny i wiele innych [42]. Dotychczasowe badania PSD po niedokrwieniu mózgu wykazały znaczny przyrost ilości białka związanego z tą strukturą, który odzwierciedlał przyrost objętości PSD obserwowany w mikroskopie elektronowym [18,23,35,58]. Mając na uwadze złożone oddziaływania składników PSD wydaje się, że przebudowa zagęszczeń postsynaptycznych jest jednym z pierwszych etapów szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału. Kaskada zdarzeń zapoczątkowanych niedokrwieniem rozprzestrzenia się od miejsc kontaktu synaptycznego na wszystkie przedziały komórkowe i oddziałuje na funkcję struktur wewnątrzkomórkowych (mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej, jądra komórkowego, cytoszkieletu), jak również obejmuje białka macierzy zewnątrzkomórkowej.

W badaniach prowadzonych na modelu krótkotrwałego niedokrwienia mózgu gerbilla oraz w przedłużonej do 15 minut ischemii mózgu szczura zaobserwowano wzrost ilości białek związanych z PSD zarówno w obrazach ultrastrukturalnych, jak i posługując się metodą *western blot* z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających aktywne formy kinaz białkowych [18,58]. Jednym z białek charakterystycznych dla PSD jest kinaza białkowa II, której aktywność zależy od jonów  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny (CamKII). CamKII jest translokowana do PSD już w pierwszych sekundach ischemii mózgu. Jednocześnie aktywność tej kinazy mierzona wobec egzogenego, jak i endogenego substratu jest większa niż w mózgu kontrolnym, jednak wzrost aktywności jest mniejszy, niż można by wnioskować na podstawie przyrostu ilości białka. Nasze badania [18], jak i doniesienia innych [1,24] sugerują, że masowy przyrost ilości CamKII w czasie niedokrwienia kompensuje hamowanie aktywności fosforylacyjnej, które występuje w czasie załamania energetycznego w niedokrwionych neuronach. Ponadto obniża się aktywność CamKII w innych frakcjach błonowych. Wyniki te wskazują na istotną rolę CamKII w reakcji ischemicznej zagęszczeń postsynaptycznych. Równie istotny wydaje się udział kinaz białkowych C (PKC).

PKC obejmuje rodzinę 11 serynowo-treoninowych kinaz białkowych, których aktywność zależy od fosfolipidów i w zależności od podgrupy od  $Ca^{2+}$  i diacyloglicerolu [37,38]. PKC pełni kluczową rolę w niemal wszystkich procesach komórkowych włączając w to podziały, różnicowanie czy homeostazę jonową. Izoformom PKC przypisuje się też regulacyjną rolę w procesie apoptozy i regeneracji [36]. Z prac wielu badaczy oraz naszych obserwacji na modelu niedokrwienia mózgu gerbilla wiemy o szybkiej aktywacji izoform PKC regulowanych jonami wapnia  $Ca^{2+}$  i diacyloglicerolem (cPKC), jak również



izoform, których aktywność nie zależy od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (nPKC) [8,17,46]. PKC obecnej w PSD przypisuje się rolę jednego z regulatorów aktywności receptora NMDA [26] oraz wpływ na aktywność szlaku MAPK poprzez oddziaływanie z kinazą Raf-1 [52].

Kinazy białkowe należące do rodziny PKC reagują na stres ischemiczny szybką zmianą aktywności obserwowaną już w pierwszym okresie po przywróceniu krążenia [17]. W PSD po niedokrwieniu następuje 4–18-krotny przyrost ilości białka różnych izoform PKC w porównaniu z ich ilością u zwierząt kontrolnych [58]. Pośród cPKC obserwujemy 10-krotny przyrost powszechnie występujących izoform  $\alpha$  i  $\beta$ , podczas gdy poziom izoformy  $\gamma$ , specyficznej dla neuronów podwyższa się dwukrotnie. Prawdopodobnie jest to spowodowane najwyższym kontrolnym poziomem tej izoformy w PSD. Ponadto, nasze badania po raz pierwszy pokazały spowodowane ischemią przemieszczenie do PSD izoform  $\delta$  i  $\epsilon$ , których kontrolny poziom w tej strukturze jest niemal niewykrywalny. Badania na izolowanej, oczyszczonej frakcji PSD zostały potwierdzone badaniami immunohistochemicznymi w mikroskopie elektronowym, które pokazują utrzymujący się co najmniej do 24 godzin po przywróceniu krążenia znaczny przyrost wielkości zagęszczeń postsynaptycznych i ilości cPKC, głównie w części CA1 hipokampów.

W badaniach wykorzystujących izolowaną frakcję PSD pochodzącą z mózgów zwierząt poddanych ischemii lub ze skrawków hipokampa w warunkach symulujących tę patologię wykazano, że poza wspomnianymi kinazami białkowymi enzymy proteolityczne – kalpainy są elementem struktury PSD [18]. Dwie izoformy kalpainy:  $\mu$  i  $m$  mają różne wymagania dotyczące stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  koniecznych do ich aktywacji. Stwierdzono, że ischemia obniża ilość białka  $\mu$ -kalpainy w PSD, podczas gdy poziom  $m$ -kalpainy nie zmienia się. Jednocześnie obserwowano obniżenie ilości fodryny, która jest białkiem cytoszkieletowym obecnym w PSD i substratem kalpain. Wydaje się, że obniżenie ilości enzymu proteolitycznego aktywowanego już w mikromolarnym stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  ma znaczenie ochronne i zabezpiecza komórki przed rozległą degradacją cytoszkieletu.

W wielobiałkowym kompleksie PSD kinazy białkowe CamKII i PKC wydają się mieć wiele funkcji. Po przebytych epizodzie niedokrwinnym mogą one aktywować różnorodne ścieżki sygnałowe, często o przeciwstawnej funkcji, między innymi mogą modulować aktywność kinazy białkowej Raf-1. Jej ilość w strukturze PSD także rośnie po niedokrwieniu, co w konsekwencji może zmieniać aktywność szlaków kinaz białkowych, w tym MAPK. Jednocześnie pewna pula kinazy Raf-1 może być związana z mitochondriami, gdzie ma swoje specyficzne substraty różne od tych, które może fosforylować, gdy występuje przy błonie plazmatycznej [7,53].

## ISCHEMIA I SZLAKI KINAZ MAP I JNK

Jednym z lepiej poznanych wieloetapowych szlaków kontrolujących ekspresję genów jest szlak MAPK. W zależności od bodźca pobudzającego lub modyfikacji białek towarzyszących w tworzeniu sieci sygnalizacyjnej, kinazy te wykazują plejotropowe działania. Obecnie rodzina kinaz MAP dzielona jest na trzy grupy, w zależności od końcowej kinazy szlaku: ERK1,2; p38/SAPK oraz JNK/SAPK [27].

Szlak prowadzący do aktywacji ERK1,2 zaangażowany jest głównie w procesy podziału, wzrostu i funkcjonowania komórek w odpowiedzi na czynniki wzrostowe, ale także na niespecyficzne bodźce stresowe [22]. Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  i depolaryzacja są także czynnikami aktywującymi kinazy ERK1 i 2 prawdopodobnie w wyniku stymulacji białek syn-GAP i Ras [44]. Białko syn-GAP jest charakterystyczne dla zagęszczeń postsynaptycznych i moduluje aktywność białka Ras o aktywności GTP-azowej, które z kolei kontroluje aktywność kinazy Raf-1, wpisanej jako jedno z pierwszych białek kaskady MAPK [31]. Białko synGAP podlega negatywnej regulacji poprzez fosforylację przez kinazę CamKII [10], co w efekcie wpływa na szybkość całego szlaku. Istnieje także możliwość modulacji ERK1,2 przez kinazę białkową C (PKC) poprzez jej oddziaływanie z kinazą Raf-1.

Ścieżka p38/SAPK łączona jest z reakcjami komórek na różnorodny stres, który prowadzi do aktywacji szlaku apoptozy. Z reakcją stresową komórek wiąże się również aktywacja szlaku JNK/SAPK, jednak jak pokazują badania mutantów pozbawionych JNK1 i 2, szlak ten jest niezbędny w procesie apoptozy rozwojowej i prawidłowego formowania układu nerwowego [9]. Kinaza JNK aktywowana jest w wyniku przekazywania sygnału poprzez co najmniej dwa różne kompleksy białkowe. Pierwszy szlak obejmuje kompleks tworzony przez białko JIP1 z kinazami MLK i MKK7, która aktywuje JNK [56]. Lokalizacja kompleksu przy powierzchni komórki sugeruje powiązanie z receptorami odbierającymi bodźce zewnątrzkomórkowe. Na podstawie badań *in vitro* istnieją dowody, że białko PSD-95, które jest typowe dla zagęszczeń postsynaptycznych, odgrywa kluczową rolę w aktywacji JNK poprzez bezpośrednie oddziaływanie z kinazą MLK [47]. JNK jest również aktywowana przez inną kinazę szlaku MAPK - MKK4, która nie łączy się z białkiem JIP, ale nie można wykluczyć obecności innych białek kompleksujących. Jednym z podstawowych substratów JNK jest jedno z białek czynnika transkrypcyjnego AP1 – białko c-Jun. Wydaje się, że zależna od fosforylacji aktywność c-Jun jest istotna w wyborze szlaku do przeżycia lub śmierci. Ostatnio coraz więcej doniesień łączy aktywność kinazy JNK z mitochondriami, sugerując, że taka lokalizacja komórkowa odgrywa istotną rolę w procesie apoptozy [12,25,29].

W wyniku krótkotrwałej ischemii mózgu obserwowana jest aktywacja zarówno przeżyciowych ERK 1,2, jak i JNK [57]. Jednak równowaga pomiędzy aktywnością tych dwóch ścieżek sygnałowych jest różna w różnych rejonach hipokampa. I tak w rejonach, które nie wykazują cech uszkodzenia po niedokrwieniu (CA2, 3, zakręt zębaty), już w pierwszych godzinach po przywróceniu krążenia ilość aktywnych form ERK1,2 (P-ERK) wzrasta dwukrotnie, a po 24 godzinach aż 6-krotnie w stosunku do kontroli, i na tak wysokim poziomie utrzymuje się przez kolejne dni. We wrażliwej na niedokrwienie części CA1 przyrost ilości P-ERK1,2 nie jest istotny statystycznie i występuje przejściowo po 24 i 48 godzinach po ischemii. Jednocześnie w rejonie CA1 ilość aktywnej formy JNK (P-JNK) wzrasta w stosunku do kontroli już po 3 godzinach po niedokrwieniu i pozostaje na wysokim poziomie przez kolejne dni. W pozostałych, niewrażliwych na krótkotrwałe niedokrwienie rejonach hipokampa, wzrost ilości P-JNK występuje przejściowo, 24 godziny po przywróceniu krążenia i jest znacznie mniejszy niż ilość aktywnych form ERK1,2. Wydaje się zatem, że stres ischemiczny powoduje aktywację



obu szlaków MAPK, przy czym zmieniona zostaje równowaga pomiędzy ścieżką ERK i JNK [57]. Na podstawie obrazu morfologicznego hipokampa w 7 dni po niedokrwieniu można przypuszczać, że dominacja szlaku ERK nad ścieżką JNK w rejonach CA2, 3 i w zakręcie zębatym skutkuje „przewyciężeniem” stresu ischemicznego i promuje przeżycie.

W poszukiwaniu kolejnych etapów kaskady przekazywania sygnału ischemicznego w rejonie CA1 badano fosforylację podstawowego substratu JNK, jakim jest białko c-Jun czynnika transkrypcyjnego AP1 [57]. Wydaje się, że wzrost fosforylacji tego białka odgrywa istotną rolę w pierwszych godzinach po przywróceniu krążenia, natomiast w dłuższym czasie poziom P-c-Jun powraca do wartości kontrolnych. Ze względu na długotrwały wzrost ilości aktywnej formy JNK kolejne badania udziału tego białka w poischemicznej śmierci neuronów dotyczyły innych przypuszczalnych substratów i translokacji aktywnej kinazy do mitochondriów.

## ISCHEMIA, MITOCHONDRIA I APOPTOZA

Najnowsze badania wydają się potwierdzać dawno powstałą hipotezę o kluczowej roli mitochondriów w uszkodzeniu poischemicznym [13,20]. Mitochondria oprócz swej powszechnie znanej funkcji tworzenia związków wysokoenergetycznych biorą czynny udział w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz procesu apoptozy. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że cytochrom c może, oprócz swojej funkcji w łańcuchu oddechowym, pełnić rolę aktywatora kompleksu białkowego (apoptosomu), którego składnikami są proenzymy proteolityczne – kaspazy 9 i 3. Aktywacja apoptosomu prowadzi do aktywacji kaspaz i degradacji komórki [40]. Istnieje hipoteza zakładająca udział magakanalu (MPT) występującego w błonach mitochondrialnych, w wypływie do cytoplazmy białek o niskich masach cząsteczkowych, w tym również cytochromu c i innych białek proapoptotycznych (AIF, endonukleaza G, Smac/Diablo) [45]. Jednak z doświadczeń z zastosowaniem związków zamykających kanał MPT wynika, że nie jest to jedyny mechanizm uwalniania białek z mitochondriów. W procesie tym podnoszona jest rola białek z rodziny Bcl, z których niektóre mają właściwości ochronne dla komórek (Bcl2, Bclxl), a inne sprzyjają uruchomieniu procesu apoptozy (Bax, Bid, Bad, Bik) [11,32]. Wydaje się, że białka Bcl2 i Bclxl mogą modulować otwarcie kanału MPT. Równowaga pomiędzy pro- i antyapoptotycznymi białkami z rodziny Bcl związanymi z mitochondriami może odgrywać istotną rolę w uruchamianiu kaskady proteaz. Dodatkowo, na funkcje białek z rodziny Bcl mogą wpływać modyfikacje posttranslacyjne, głównie fosforylacje przez kinazy Raf-1 i JNK. Z badań *in vitro* pochodzą przesłanki, że enzymy te mogą modulować przepuszczalność błony mitochondrialnej poprzez oddziaływanie z pro- i anty-apoptotycznymi białkami z rodziny Bcl [3,25,50]. A zatem, podobnie jak balans pomiędzy białkami z rodziny Bcl, jak i równowaga pomiędzy związanymi z błonami mitochondrialnymi aktywnymi kinazami Raf-1 i JNK może wpływać na integralność zewnętrznej błony mitochondrialnej.

W modelu opóźnionej poniedokrwiennej śmierci neuronów w hipokampie gerbilla wykazano przejściową, występującą w krótkim czasie reperfuzji (0,5–1 godziny)

obecność cytochromu c w cytoplazmie [15]. Ponownie cytochrom c w cytoplazmie wykrywany jest po 24 aż do około 72 godzin po przywróceniu krążenia, równocześnie z pierwszymi morfologicznymi oznakami śmierci neuronów. Można sugerować, że wpływ cytochromu c z mitochondriów jest czułym markerem ich uszkodzenia. Wykazano, że wczesne zastosowanie 0,5  $\mu\text{M}$  cyklospory A (CsA) ma działanie ochronne dla komórek. Cyklosporyna A jest lekiem, który prócz swojej dobrze znanej aktywności immunosupresyjnej może stabilizować błonę mitochondrialną i blokować wpływ niskocząsteczkowych białek, w tym cytochromu c. Z naszych badań *in vitro* i *in vivo* wynika, że CsA hamuje wczesną fazę wpływu cytochromu c z mitochondriów i zabezpiecza neurony rejonu CA1 hipokampa przed uszkodzeniem [15]. Natomiast zastosowanie CsA później niż 1 godzinę po przywróceniu krążenia nie chroni komórek przed śmiercią.

Postawiono zatem pytanie, czy brak neuroprotekcji przy opóźnionym podaniu CsA wiąże się z przebudową błony mitochondrialnej tak, że staje się ona niewrażliwa na ten lek?

Określono poziom związanych z mitochondriami kompleksów białkowych składających się z pro-apoptotycznego białka Bad i antyapoptotycznego Bcl2 oraz przypuszczalnie fosforylujących je aktywnych form kinaz białkowych Raf-1 i JNK w różnym czasie po ischemii [13,57]. O ile ochronne dla komórek białko Bcl2 fizjologicznie lokalizuje się głównie w mitochondriach oraz w innych błonowych strukturach wewnątrzkomórkowych, to proapoptotyczne białko Bad jest fosforylowane i pozostaje nieaktywne w cytoplazmie w kompleksie z białkiem 14-3-3 [47]. W przebiegu reperfuzji obserwowano trwały przyrost ilości białka Bad związanego z mitochondriami, z jednoczesnym, przejściowo obniżonym poziomem fosforylującej go kinazy Raf-1. Równolegle w cytoplazmie obniżała się ilość ufosforylowanej, nieaktywnej proapoptotycznie formy Bad [13]. Występowanie kinazy Raf-1 w mitochondriach zostało dodatkowo potwierdzone znalezieniem kompleksu białek Bad i P-Raf-1 otrzymanych metodą koimmunoprecypitacji z preparatów oczyszczonych mitochondriów izolowanych z hipokampów gerbilla. W tym samym, późnym okresie po niedokrwieniu wykazano we frakcji mitochondrialnej przyrost ilości aktywnej formy kinazy JNK [57], która może fosforylować/dezaktywować antyapoptotyczne białka Bcl2 i Bclxl. Translokację białka Bad do mitochondriów potwierdziły obserwacje w mikroskopie elektronowym. Badano komórkową lokalizację białek Bad i Bcl2 metodą immunocytochemiczną z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał znakowanych cząsteczkami złota. Wykazano poniedokrwienne przemieszczenie białka Bad do mitochondriów jedynie w rejonie CA1 hipokampa, natomiast obrazy rejonu zakrętu zębatego (DG) nie wykazywały zmian lokalizacji badanych białek w przebiegu reperfuzji [13]. Wydaje się zatem, że odległe w czasie od epizodu niedokrwienego tworzenie indukowanych bodźcem ischemicznym kompleksów Bad-Bcl2 oraz zmieniona lokalizacja komórkowa kinaz białkowych Raf-1 i JNK są elementami przebudowy błon mitochondrialnych, które stają się przepuszczalne dla cytochromu c, niezależnie od obecności cyklosporyny A. Poniedokrwienne zachwianie równowagi pomiędzy ilością ochronnej P-Raf-1 i aktywowanej stresem P-JNK może wpływać na skierowanie komórki na ścieżkę prowadzącą do śmierci poprzez uwolnienie z mitochondriów białek aktywujących kompleks apoptosomu (w tym cytochromu c) i w efekcie kaspazę 3.

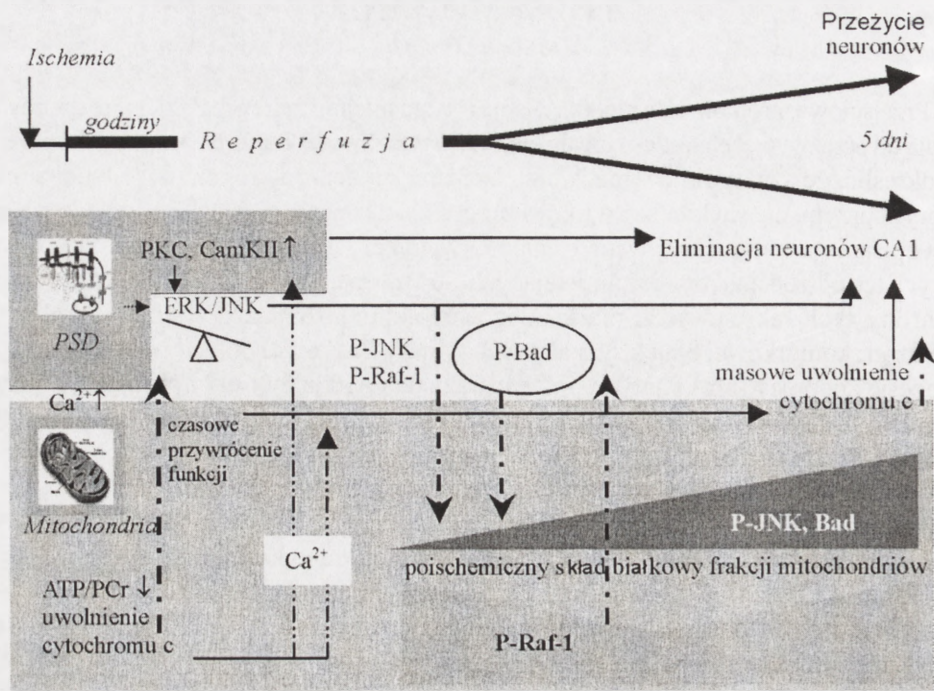


## PODSUMOWANIE

Przejściowe, krótkotrwałe niedokrwienie mózgu inicjuje szereg reakcji, które doprowadzają do przewyciężenia stresu lub do eliminacji wrażliwych komórek nerwowych. Trzeba podkreślić, że szczególnie wrażliwe na ischemię są neurony rejonu CA1 hipokampa, którym przypisuje się kluczową rolę w procesie uczenia się. Dlatego niezwykle ważne jest opisanie procesów inicjowanych niedokrwieniem zarówno w komórkach przeżywających ten epizod, jak również umierających, aby można było znaleźć skuteczne sposoby ochrony tych tak istotnych dla każdego organizmu komórek. Zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek sygnałowych (kinazy białkowe) oraz uczestniczących w procesie apoptozy (pro- i anty-apoptotyczne białka z rodziny Bcl) wpisują się w coraz bardziej skomplikowany obraz reakcji poniedokrwiennej tkanki nerwowej. Sekwencja zdarzeń opisywanych w niedokrwionych komórkach wskazuje na wiele równoległe aktywowanych szlaków metabolicznych, które pozostają w ściśle określonych relacjach i oddziałują nawzajem na siebie. Próby stworzenia mapy szlaków komplikuje fakt, że ten sam enzym/białko może występować w wielu regionach komórki, gdzie pełni różne funkcje. Jednym z takich białek sygnałowych jest kinaza białkowa Raf-1; jedna z pierwszych w kaskadzie MAPK, której aktywacja zależy od białka Ras i regulacji jego aktywności. Pierwsze elementy kompleksu zlokalizowane są w zagęszczeniach postsynaptycznych (PSD). Do niedawna uważano, że jest to jedyne miejsce działania Raf-1. Obecnie wiadomo, że aktywna kinaza białkowa Raf-1 może być związana z mitochondriami, gdzie pełni różne funkcje, np. fosforyluje pro-apoptotyczne białko Bad [48] oraz co ciekawsze, tworzy kompleks z białkiem VDAC, które wchodzi w skład megakanalu i moduluje przepuszczalność kanału. Wydaje się, że dzieje się to poprzez zmiany konformacji białek kompleksu, a nie poprzez fosforylację któregoś z jego elementów ([33]. Z przeglądu piśmiennictwa wyłania się spójny obraz, że zlokalizowana mitochondrialnie kinaza Raf-1 chroni komórki przed apoptozą.

Na podstawie obserwacji własnych oraz danych z literatury można sugerować, że tworzenie się nowych, wywołanych przez krótką ischemię patologicznych kompleksów białkowych, zlokalizowanych w miejscach kontaktu synaptycznego (PSD) oraz w mitochondriach może wpływać istotnie na pro-apoptotyczne ukierunkowanie sygnału ischemicznego w okresie reperfuzji we wrażliwym rejonie CA1 hipokampa.

Zagęszczenia postsynaptyczne reagują na niedokrwienie, co objawia się bardzo szybkim, znaczącym przyrostem ilości białek i objętości struktury. Białka szkieletowe z rodziny PSD 95 stanowią „kotwicę” dla wielu kinaz białkowych (między innymi izoform PKC), które wpływają na aktywność receptorów dla neurotransmiterów z jednej strony i zmiany aktywności kaskad przekazywania sygnału do wnętrza komórek z drugiej. Istotnym elementem translokacji kinaz białkowych do PSD są jony wapnia, których stężenie w cytoplazmie zwiększa się w czasie niedokrwienia. Zmienione w wyniku przejściowego niedokrwienia kompleksy białkowe w PSD wydają się wpływać na aktywność szlaków kinaz białkowych MAPK i JNK. Wydaje się, że w komórkach CA1 hipokampa przewaga aktywności szlaku JNK stanowi istotny element procesu prowadzącego do eliminacji tych neuronów.



RYCINA 1. Schemat przedstawia zjawiska związane z ewolucją zmian wewnątrzkomórkowych prowadzących do opóźnionej, poischemicznej śmierci neuronów we wrażliwym na ischemię rejonie CA1 hipokampa. W czasie reperfuzyji po 5-minutowej ischemii mózgu gerbilla następuje przemieszczanie białek do zagęszczeń postsynaptycznych (PSD) oraz do i z mitochondriów. Już w trakcie niedokrwienia oraz krótkim czasie reperfuzyji w PSD przyrasta ilość kinaz białkowych PKC i CamKII, natomiast w mitochondriach czasowo obserwowane jest zmniejszenie ilości aktywnej kinazy Raf-1. Jednocześnie w cytoplazmie przejściowo obserwowany jest cytochrom c. Równowaga pomiędzy aktywnymi formami kinaz ERK i JNK przychyła się w kierunku JNK. W dłuższym czasie po przywróceniu krążenia (>24 godziny) z mitochondriami związana jest coraz większa ilość kinazy JNK oraz proapoptotycznego białka Bad, a w cytoplazmie ponownie pojawia się cytochrom c:  $\uparrow$  – wzrost zawartości,  $\downarrow$  – obniżenie zawartości,  $\rightarrow$  – translokacja

Równocześnie ze zmianami składu białkowego PSD, w badanym przez nas modelu niedokrwienia mózgu gerbilla obserwujemy w czasie reperfuzyji dwufazowy wpływ cytochromu c z mitochondriów. Wczesny, przejściowy wpływ prawdopodobnie pełni funkcję amplifikującą sygnał prowadzący do śmierci neuronów. Długotrwały wpływ cytochromu c obserwowany od drugiej doby po przywróceniu krążenia wydaje się być związany z fazą masowej aktywacji proteaz. Wydaje się, że zmienione na skutek krótkotrwałego niedokrwienia kompleksy sygnałowych kinaz białkowych z zewnętrzną błoną mitochondrialną przyczyniają się zarówno do wczesnego, jak i późnego wpływu cytochromu c z mitochondriów, a tym samym do uruchomienia kaskady kaspaz.

Ostatnio ukazała się praca wskazująca na nową, kolejną rolę cytochromu c w przedłużaniu i rozprzestrzenianiu sygnału wzbudzonego stresem [5]. W badaniach *in vitro* wykazano, że cytochrom c łączy się z receptorami IP3 zlokalizowanymi w siateczce



śródpłazmatycznej, powoduje trwałe otwarcie kanałów błonowych i wypływ jonów wapnia do cytoplazmy. Te z kolei mogą powodować wtórne uszkodzenie mitochondriów. Koncepcja ta jest zgodna z wynikami naszych badań i wnioskami sformułowanymi na podstawie obserwacji cytochromu c niezwiązanego z mitochondriami w pierwszym okresie reperfuzji po przejściowym niedokrwieniu mózgu [15]. Ponadto, z naszych wstępnych doświadczeń *in vivo* wynika, że w krótkim czasie po przywróceniu krążenia (30 minut) po niedokrwieniu, cytochrom c związany jest z frakcją mikrosomów. Tym samym potwierdza się hipoteza o udziale cytochromu c w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału wywołanego ischemią mózgu.

Zmiany składu białkowego zagęszczeń postsynaptycznych oraz translokacja białek do i z mitochondriów wydają się być istotnym elementem procesu opóźnionej poischemicznej śmierci neuronów. Schemat uproszczonej sekwencji przemieszczania białek sygnałowych w PSD i mitochondriach w procesie poniedokrwiennej, opóźnionej śmierci neuronów w sektorze CA1 hipokampa przedstawiono na rycinie 1.

Na podstawie przedstawionych wyników badań można pokusić się o wysnucie kilku bardziej ogólnych wniosków, które odnoszą się zarówno do procesu poischemicznej śmierci neuronów, jak i mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów wewnątrzkomórkowych.

1. Przejściowa ischemia mózgu inicjuje w niedokrwionych komórkach szybkie zmiany w wewnątrzkomórkowej lokalizacji, a tym samym funkcji białek sygnałowych.

2. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa białka może określać jego aktywność i udział w odmiennych szlakach metabolicznych.

3. Wielobiałkowe kompleksy, tworząc dynamiczne struktury funkcjonalne wyższego rzędu, mogą istotnie wpływać na los komórki w odpowiedzi na stres niedokrwienno.

## LITERATURA

- [1] ARONOWSKI J, GROTTA JC. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in postsynaptic densities after reversible cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1996; **709**: 103–110.
- [2] ATTWELL D, BARBOUR B, SZATKOWSKI M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 1993; **11**: 401–407.
- [3] BAE J, HSU SY, LEO CP, ZELL K, HSUEH AJ. Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis* 2001; **6**: 319–330.
- [4] BERG D, HOLZMANN C, RIESS O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 752–762.
- [5] BOEHNING D, PATTERSON RL, SEDAGHAT L, GLEBOVA NO, KUROSAKI T, SNYDER SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 1051–1061.
- [6] BRENNER C, KROEMER G. Apoptosis. Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 2000; **289**: 1150–1151.
- [7] BRONISZ A, GAJKOWSKA B, DOMANSKA-JANIK K. PKC and Raf-1 inhibition-related apoptotic signalling in N2a cells. *J Neurochem* 2002; **81**: 1176–1184.
- [8] CARDELL M, BINGREN H, WIELOCH T, ZIVIN J, SAITOH T. Protein kinase C is translocated to cell membranes during cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 1990; **119**: 228–232.
- [9] CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; **410**: 37–40.
- [10] CHEN HJ, ROJAS-SOTO M, OGUNI A, KENNEDY MB. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 1998; **20**: 895–904.

- [11] CORY S, ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 647–656.
- [12] DENG X, XIAO L, LANG W, GAO F, RUVOLO P, MAY WS, JR. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23681–23688.
- [13] DLUZNIEWSKA J, BERSEWICZ M, WOJEWODZKA U, GAJKOWSKA B, ZABLOCKA B. Transient cerebral ischemia induces delayed proapoptotic bad translocation to mitochondria in CA1 sector of hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; **133**: 274–280.
- [14] DOMANSKA-JANIK K, BONG P, BRONISZ-KOWALCZYK A, ZAJACH, ZABLOCKA B. AP1 transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 1999; **57**: 840–846.
- [15] DOMANSKA-JANIK K, BUZANSKA L, DLUZNIEWSKA J, KOZLOWSKA H, SARNOWSKA A, ZABLOCKA B. Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; **121**: 50–59.
- [16] DOMANSKA-JANIK K, LAZAREWICZ J, NOREMBERG K, STROSZNAJDER J, ZALEWSKA T. Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem Res* 1985; **10**: 649–665.
- [17] DOMANSKA-JANIK K, ZABLOCKA B. Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. *Mol Chem Neuropathol* 1993; **20**: 111–123.
- [18] DOMANSKA-JANIK K, ZALEWSKA T, ZABLOCKA B, OSTROWSKI J. Ischemia-induced modifications of protein components of rat brain postsynaptic densities. *Neurochem Int* 1999; **34**: 329–336.
- [19] FISKUM G. Involvement of mitochondria in ischemic cell injury and in regulation of intracellular calcium. *Am J Emerg Med* 1983; **1**: 147–153.
- [20] FISKUM G, MURPHY AN, BEAL MF. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 351–369.
- [21] GADAMSKI R, MOSSAKOWSKI M.J. Asymetric damage of the CA1 sector of amon's horn after short-term forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Neropatologia Polska* 1992; **30**: 209–219.
- [22] GOZDZ A, HABAS A, JAWORSKI J, ZIELINSKA M, ALBRECHT J, CHLYSTUN M, JALILI A, HETMAN M. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the neuroprotective activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 by cisplatin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 43663–43671.
- [23] HU BR, PARK M, MARTONE ME, FISCHER WH, ELLISMAN MH, ZIVIN JA. Assembly of proteins to postsynaptic densities after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; **18**: 625–633.
- [24] HU BR, WIELOCH T. Persistent translocation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II to synaptic junctions in the vulnerable hippocampal CA1 region following transient ischemia. *J Neurochem* 1995; **64**: 277–284.
- [25] ITO Y, MISHRA NC, YOSHIDA K, KHARBANDA S, SAXENA S, KUFED. Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 794–800.
- [26] JIMENEZ B, TAPIA R. Biochemical modulation of NMDA receptors: role in conditioned taste aversion. *Neurochem Res* 2004; **29**: 161–168.
- [27] JOHNSON GL, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; **298**: 1911–1912.
- [28] KENNEDY MB. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 2000; **290**: 750–754.
- [29] KHARBANDA S, SAXENA S, YOSHIDA K, PANDEY P, KANEKI M, WANG Q, CHENG K, CHEN YN, CAMPBELL A, SUDHA T, YUAN ZM, NARULA J, WEICHSELBAUM R, NALIN C, KUFED. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2000; **275**: 322–327.
- [30] KIRINO T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; **239**: 57–69.
- [31] KOMIYAMA NH, WATABE AM, CARLISLE HJ, PORTER K, CHARLESWORTH P, MONTI J, STRATHDEE DJC, O'CARROLL CM, MARTIN SJ, MORRIS RGM, O'DELL TJ, GRANT SGN. SynGAP Regulates ERK/MAPK Signaling, Synaptic Plasticity, and Learning in the Complex with Postsynaptic Density 95 and NMDA Receptor. *J Neurosci* 2002; **22**: 9721–9732.
- [32] KRAJEWSKI S, MAI JK, KRAJEWSKA M, SIKORSKA M, MOSSAKOWSKI MJ, REED JC. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 1995; **15**: 6364–6376.
- [33] LE MELLAY V, TROPFMAIR J, BENZ R, RAPP UR. Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. *BMC Cell Biol* 2002; **3**: 14.
- [34] LEVY FH, KELLY DP. Regulation of ATP synthase subunit e gene expression by hypoxia: cell differentiation stage-specific control. *Am J Physiol* 1997; **272**: C457–C465.
- [35] MARTONE ME, JONES YZ, YOUNG SJ, ELLISMAN MH, ZIVIN JA, HU BR. Modification of postsynaptic densities after transient cerebral ischemia: a quantitative and three-dimensional ultrastructural study. *J Neurosci* 1999; **19**: 1988–1997.



- [36] METZGER F, KAPFHAMMER JP. Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity. *Cerebellum* 2003; **2**: 206–214.
- [37] NISHIZUKA Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; **334**: 661–665.
- [38] NISHIZUKA Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; **258**: 607–614.
- [39] OBRENOVITCH TP, RICHARDS DA. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; **7**: 1–54.
- [40] ORRENIUS S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 2004; **149**: 19–23.
- [41] PAHLMARK K, FOLBERGROVA J, SMITH ML, SIESJO BK. Effects of dimethylthiourea on selective neuronal vulnerability in forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1993; **24**: 731–736.
- [42] PENG J, KIM MJ, CHENG D, DUONG DM, GYGI SP, SHENG M. Semiquantitative Proteomic Analysis of Rat Forebrain Postsynaptic Density Fractions by Mass Spectrometry. *J Biol Chem* 2004; **279**: 21003–21011.
- [43] PHILLIS JW, O'REGAN MH. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 2003; **43**: 461–467.
- [44] ROSEN LB, GINTY DD, WEBER MJ, GREENBERG ME. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* 1994; **12**: 1207–1221.
- [45] SAELENS X, FESTJENS N, VANDE WL, VAN GURP M, VAN LOO G, VANDENABEELE P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; **23**: 2861–2874.
- [46] SALUJA I, O'REGAN MH, SONG D, PHILLIS JW. Activation of cPLA2, PKC, and ERKs in the rat cerebral cortex during ischemia/reperfusion. *Neurochem Res* 1999; **24**: 669–677.
- [47] SAVINAINEN A, GARCIA EP, DOROW D, MARSHALL J, LIU YF. Kainate receptor activation induces mixed lineage kinase-mediated cellular signaling cascades via post-synaptic density protein 95. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11382–11386.
- [48] SCHEID MP, SCHUBERT KM, DURONIO V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31108–31113.
- [49] SIESJO BK, ELMER E, JANELIDZE S, KEEP M, KRISTIAN T, OUYANG YB, UCHINO H. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1999; **73**: 7–13.
- [50] TOURNIER C, HESS P, YANG DD, XU J, TURNER TK, NIMNUAL A, BAR-SAGI D, JONES SN, FLAVELL RA, DAVIS RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; **288**: 870–874.
- [51] TRAYSTMAN RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 2003; **44**: 85–95.
- [52] UEDA Y, HIRAI S, OSADA S, SUZUKI A, MIZUNO K, OHNO S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 1996; **271**: 23512–23519.
- [53] WANG HG, REED JC. Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors* 1998; **8**: 13–16.
- [54] WIELOCH T, KAMME F. Cell signaling and ischemic neuronal death. 1998; 440–454.
- [55] WILLIAMS V, GROSSMAN RG. Ultrastructure of cortical synapses after failure of presynaptic activity in ischemia. *Anat Rec* 1970; **166**: 131–141.
- [56] YASUDA J, WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, SHARMA M, DAVIS RJ. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 7245–7254.
- [57] ZABLOCKA B, DLUZNIĘWSKA J, ZAJAC H, DOMANSKA-JANIK K. Opposite reaction of ERK and JNK in ischemia vulnerable and resistant regions of hippocampus: involvement of mitochondria. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; **110**: 245–252.
- [58] ZABLOCKA B, GAJKOWSKA B, CZECHMANSKA T, DOMANSKA-JANIK K. Isoforms of protein kinase C in postsynaptic densities after cerebral ischemia. *Brain Res* 2001; **889**: 105–111.
- [59] ZIPFEL GJ, BABCOCK DJ, LEE JM, CHOI DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma* 2000; **17**: 857–869.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 10.05.2005 r.

Przyjęto: 22.06.2005 r.

ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa,





## ROŚLINNE BIAŁKA DYNAMINO-PODOBNE – WGLĄD W EWOLUCJĘ MASZYNERII PODZIAŁU MITOCHONDRIÓW I PLASTYDÓW

### PLANT DYNAMIN-LIKE PROTEINS – INSIGHTS INTO THE EVOLUTION OF DIVISION MACHINERY OF MITOCHONDRIA AND PLASTIDS

Jolanta WIEJAK, Agnieszka CHOŁUJ, Elżbieta WYROBA

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

**Streszczenie:** Dynamina i białka dynamino-podobne (DRP) uczestniczą w wielu procesach istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki oraz całego organizmu. Występują zarówno u zwierząt, jak i u roślin. U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano już 16 białek dynamino-podobnych, które podzielono na 6 podrodzin. Białka DRP1 oraz ich homolog fragmoplastyna z soi biorą udział w tworzeniu przegrody pierwotnej podczas cytokinezy. Dwa białka z podrodziny DRP2 wykazują budowę domenową podobną do klasycznych dynamin ssaków i uczestniczą w procesie endocytozy, gdzie związane są z pęcherzykami opłaszczonymi klatryną. Ponadto u *Arabidopsis* i krasnorostu *Cyanidioschyzon merolae* zidentyfikowano białka dynamino-podobne, które stanowią elementy maszynerii podziału mitochondriów i chloroplastów. Organelle te, które powstały w wyniku endosymbiozy wolnożyjących *Prokaryota*, początkowo dzieliły się w bardzo podobny sposób oparty na pierścieniach FtsZ pochodzenia prokariotycznego, PD/MD – pochodzenia eukariotycznego oraz pierścieniu dynaminowym. W toku ewolucji maszyneria ta została zachowana tylko w chloroplastach oraz w mitochondriach niższych organizmów eukariotycznych, do których należy między innymi *C. merolae*. Natomiast u zwierząt, roślin i grzybów elementy mitochondrialnej maszynerii podziałowej pochodzenia prokariotycznego (FtsZ) zostały utracone i zastąpione przez białka dynamino-podobne.

**Słowa kluczowe:** dynamina, białka dynamino-podobne, *Arabidopsis*, mitochondria, chloroplasty, podział organelli, filogeneza.

**Summary:** Dynamins and dynamin-related proteins (DRP) participate in many processes essential for normal function of the cells and organisms. They were found both in animals and plants. In *Arabidopsis thaliana* 16 different dynamin-related proteins were identified that are grouped into six subfamilies. DRP1 and soybean fragmoplastin participate in the cell plate formation during cytokinesis. Two members of DRP2 subfamily display domain structure similar to mammalian classical dynamins and may be involved in endocytosis and membrane recycling via clathrin-coated vesicles. Dynamins-related proteins that are elements of mitochondrial and chloroplast division machinery were identified in *Arabi-*

*dopsis* and red algae *Cyanidioschyzon merolae*. These organelles that are remnants of free-living endosymbiotic prokaryotes initially divided by similar mechanisms based on FtsZ ring of prokaryotic origin, PD/MD – of eukaryotic origin and dynamin ring. In the course of evolution this system was preserved only in chloroplasts and in mitochondria of lower eukaryotes like *C. merolae*. However, in mitochondria of animals, green plants and fungi the elements of prokaryotic mitochondrial machinery (FtsZ) were replaced by dynamin-like GTPases.

*Key words:* dynamin, dynamin-related proteins, *Arabidopsis*, mitochondria, chloroplasts, organelles division, phylogenesis.

## WSTĘP

Dynamina należy do nadrodziny dużych GTP-az, która obejmuje już kilkudziesięciu przedstawicieli zarówno w świecie zwierząt, jak i roślin. Klasyczna cząsteczka dynaminy składa się z pięciu domen: N-końcowej GTP-azowej, środkowej, plekstrynowej (PH), efektorowej (GED) i C-końcowej domeny bogatej w prolinę i argininę (PRD) [36]. Zwierzęca dynamina została po raz pierwszy wyizolowana z ekstraktów mózgu wołu jako białko związane z mikrotubulami w 1989 roku [27], zaś w roku 1995 wykryto białka dynamino-podobne także u roślin [3,6].

Pierwszymi zidentyfikowanymi roślinnymi białkami dynamino-podobnymi (ang. *dynamamin-related proteins*) były fragmoplastyna z soi [6] i jej homolog ADL1 (ang. *Arabidopsis dynamamin-like*) z *Arabidopsis thaliana* [3]. Do tej pory u *Arabidopsis* wykryto już 16 białek dynamino-podobnych, które podzielono na 6 podrodzin na podstawie ich filogenezy oraz obecności funkcjonalnych motywów. Podział ten został potwierdzony przez ich lokalizację wewnątrzkomórkową oraz różnice funkcjonalne pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami tej rodziny [8].

Białka dynamino-podobne u *Arabidopsis* uczestniczą między innymi w tworzeniu przegrody pierwotnej (DRP1), endocytozie (DRP2) oraz podziale mitochondriów (DRP3) i chloroplastów (DRP5). Zidentyfikowano również 4 białka (DRP4A-D) podobne do zwierzęcych białek Mx o aktywności antywirusowej. Wszystkie 4 geny je kodujące zlokalizowane są kolejno w tej samej orientacji na chromosomie 1. DRP4A, B i D wydają się być pseudogenami, które pojawiły się najpóźniej w ewolucji i nie spełniają jeszcze żadnej funkcji. Natomiast DRP4C ulega transkrypcji, ale jego funkcja nie została jeszcze ustalona. O białku z podrodziny DRP6 wiadomo jedynie, że koduje polipeptyd o długości 251 aminokwasów, który jest znacznie mniejszy niż inne białka DRP. Nie wiadomo jednak, czy gen *DRP6* ulega transkrypcji oraz czy kodowane przez niego białko jest GTP-azą [9].

## ROLA FRAGMOPLASTYNY I JEJ HOMOLOGÓW W POWSTAWANIU PRZEGRODY PIERWOTNEJ

Fragmoplast (wrzeczono cytokinetyczne) jest to kompleks, którego głównymi składnikami są dwie grupy mikrotubul zwrócone do siebie końcami „plus” oraz mikrofilamenty aktynowe [23]. Powstaje on podczas cytokinezy w późnej anafazie i



jest odpowiedzialny za lokalizację oraz fuzję pęcherzyków podczas powstawania przegrody pierwotnej [23]. Przegroda pierwotna zaczyna się tworzyć w centrum fragmoplastu i rozszerza się na zewnątrz dzięki ciągłej fuzji pęcherzyków powstających w aparacie Golgiego i transportowanych wzdłuż mikrotubul fragmoplastu [32].

W tworzeniu przegrody pierwotnej istotną rolę odgrywa fragmoplastyna. Jest to duża GTP-aza o masie 68 kDa, która nie zawiera dwóch domen obecnych w klasycznych dynaminach: domeny plekstrynowej (PH) oraz C-końcowej domeny bogatej w prolinę i argininę (PRD) [38].

Aktywność GTP-azowa fragmoplastyny jest wymagana do skutecznego odpączkowania i transportu pęcherzyków zawierających materiał z aparatu Golgiego do powstającej przegrody pierwotnej [38]. Fragmoplastyna wykazuje zdolność do tworzenia spiralnie zwiniętych struktur, co sugeruje, że może owijać się wokół pęcherzyków opłaszczonych klatryną i zaciskać je w struktury pęcherzykowo-tubularne (ang. *vesicle-tubule-vesicle*) [32, 38]. Fragmoplastyna początkowo znajduje się w centrum przegrody pierwotnej, a następnie przemieszcza się ku jej rosnącym krawędziom [7]. Nazywana jest markerem fragmoplastu i początkowego etapu powstawania przegrody pierwotnej [32].

U *Arabidopsis* zidentyfikowano 5 białek (DRP1A-E) homologicznych do fragmoplastyny. Wykazano, że DRP1A (ADL1, ADL1A), C (ADL1C) i E (ADL1E) są związane z mikrotubulami i lokalizują się w powstającej przegrodzie pierwotnej podczas cytokinezy [9, 11, 12] oraz mogą odgrywać rolę w tworzeniu i stabilizacji błony komórkowej [11] i w cytoskieletcie [9].

W roku 2003 w doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem białka fuzyjnego GFP-DRP1 zbadano rozmieszczenie białek DRP1A, C i E podczas cyklu komórkowego [9]. Białko DRP1A w fazie G1 związane jest wyłącznie z mikrotubulami kortykalnymi. W fazie S jądro przemieszcza się do centrum komórki, zaś DRP1A nadal rozmieszczone jest w postaci nitkowatych struktur biegnących od regionu perinuklearnego w kierunku korteksu. W komórkach metafazowych DRP1A związane jest z wrzecionem mitotycznym, natomiast podczas późnej anafazy znajduje się w rejonie mikrotubul fragmoplastu i w powstającej przegrodzie pierwotnej. Pęcherzyki zawierające DRP1A mogą łączyć się ze sobą i tworzyć struktury tubularne w regionie fragmoplastu jeszcze przed osiągnięciem przegrody pierwotnej [9]. DRP1A i fragmoplastyna lokalizują się w podobny sposób w powstającej przegrodzie pierwotnej [6, 7, 12].

Białko DRP1C w komórkach mitotycznych jest także związane z mikrotubulami wrzeciona, ale nie tak silnie jak DRP1A, oraz jest rozmieszczone punktowo w całej komórce. Podczas cytokinezy przemieszcza się do powstającej przegrody pierwotnej, szczególnie do jej krawędzi [9]. Rozmieszczenie DRP1C nieco więc różni się od lokalizacji DRP1A, co sugeruje, że odgrywa ono odmienną rolę w powstawaniu przegrody pierwotnej.

DRP1E lokalizuje się w powstającej przegrodzie pierwotnej w późnych stadiach telofazy. Ulega przemieszczeniu z centralnej części przegrody do jej rosnących krawędzi. Wydaje się, że jest ono związane z siecią tubularną. Możliwe jest, że DRP1A i DRP1C są zaangażowane w tworzenie struktur tubularno-pęcherzykowych, podczas gdy DRP1E odgrywa rolę w tworzeniu sieci tubularnej. Odmiennie role tych białek w procesie

tworzenia przegrody pierwotnej są zgodne z subtelnymi różnicami w ich lokalizacji podczas różnych stadiów podziału komórki [9].

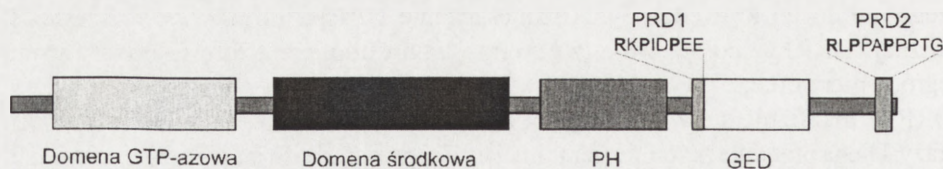
## ROŚLINNE BIAŁKA DYNAMINO-PODOBNE – ROLA W ENDOCYTOZIE

Jedynymi jak dotąd zidentyfikowanymi roślinnymi białkami dynamino-podobnymi mającymi budowę domenową identyczną z klasycznymi dynaminami ssaków są dwa białka z podrodziny DRP2 wykryte u *Arabidopsis*: DRP2A (ADL6) [10, 14, 15] i DRP2B (ADL3) [17], które wykazują 92% identyczności [9]. DRP2A charakteryzuje się obecnością domeny PH oraz dwóch potencjalnych motywów prolinowych: PRD1 (RKPIDPEE) i PRD2 (RLPPAPPPTG) (ryc. 1), które zlokalizowane są w C-końcowej części białka i odpowiadają domenie PRD [14].

Domena PH jest odpowiedzialna za oddziaływanie białek z lipidami błonowymi [17]. DRP2A ma zdolność wiązania kwasu fosfatydowego (PA), fosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP), bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP<sub>2</sub>), natomiast nie wiąże fosfatydyloseryny i fosfatydyloglicerolu. Aktywność GTP-azowa DRP2A jest stymulowana przede wszystkim przez PA, który jest istotnym wtórnym przekaźnikiem informacji w komórkach roślinnych, w przeciwieństwie do dynamin zwierzęcych, których aktywność jest stymulowana głównie przez fosfoinozytole [14, 15].

U *Arabidopsis* zidentyfikowano rodzinę białek zawierających domenę SH3 (ang. *Src homology 3*) – AtSH3P [14]. Stwierdzono, że tylko AtSH3P3 (białko strukturalnie podobne do zwierzęcej amfifizyny i endofiliny) oddziałuje z domeną PRD1, ale nie z PRD2 białka DRP2A. Wydaje się, że AtSH3P3 może być zaangażowane w wyselekcjonowanie DRP2A do kompleksu białek pomocniczych. Nie znaleziono jak dotąd białka z domeną SH3, które mogłoby oddziaływać z drugim motywem prolinowym. Być może jest to  $\alpha$ -adaptyna – składnik kompleksu adaptorowego pęcherzyków opłaszczonych klatryną w TGN, ponieważ C-terminalny koniec DRP2A oddziałuje z tym białkiem [14].

DRP2A jest obecne w postaci punktowych struktur w cytoplazmie, prawdopodobnie w aparacie Golgiego, gdzie może być istotne w dostarczaniu materiału do wakuoli [10]. Podczas cytokinezy kierowane jest do powstającej przegrody pierwotnej, natomiast tylko w niewielkiej ilości występuje w obrębie mikrotubul fragmoplastu. Może być również zaangażowane w recykling z błony komórkowej i przegrody pierwotnej w drodze endocytozy [8], gdyż



RYCINA 1. Budowa domenowa białka DRP2 (wg [14], zmodyfikowane): PH – domena plekstrynowa, GED – GTP-azowa domena efektorowa, PRD1 i PRD2 – motywy prolinowe



wykazano, że jest związane z pęcherzykami opłaszczonymi klatryną [14]. Wydaje się, że białka DRP2 mogą odgrywać istotną rolę w transporcie pęcherzyków opłaszczonych klatryną pomiędzy aparatem Golgiego, błoną komórkową, przegrodą pierwotną i wakuolami.

## MASZYNERIA PODZIAŁU MITOCHONDRIÓW I CHLOROPLASTÓW

Mitochondria i chloroplasty pochodzą od wolnożyjących *Prokaryota*, które w toku ewolucji utraciły swoją autonomię i stały się organizmami endosymbiotycznymi.

U większości *Prokaryota* główną rolę w podziale komórkowym odgrywa GTP-aza FtsZ [2, 24]. Jest to zlokalizowane w cytoplazmie białko cytoszkieletowe, które wykazuje strukturalne i biochemiczne podobieństwo do eukariotycznej tubuliny. FtsZ hydrolizuje GTP i ulega oligomeryzacji tworząc pierścień w centralnej części komórki na wewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej, który zaciska się podczas cytokinezy bakterii. Pierścień FtsZ prawdopodobnie służy jako rusztowanie, do którego przyłączają się inne białka komórkowej maszynerii podziałowej oraz może również generować siłę niezbędną do zaciśnięcia błony [24].

Mechanizm podziału mitochondriów i chloroplastów u niższych eukariota był bardzo podobny i opierał się na pierścieniach FtsZ, PD/MD (ang. *plastid-/mitochondrial-dividing ring*) oraz pierścieniu dynaminowym. Podczas ewolucji system ten został w zasadzie zachowany w chloroplastach, podczas gdy w mitochondriach zwierząt, roślin i grzybów pierścień FtsZ został utracony, pierścień MD również lub bardzo uproszczony, natomiast ich funkcje przejęły białka dynamino-podobne [2, 4, 25]. Obecność struktur pierścieniowych (MD) zaobserwowano jednak w mitochondriach współczesnych krasnorostów *Cyanidioschyzon merolae* oraz *Cyanidium* [18] oraz w dzielących się mitochondriach śluzowca *Physarum polycephalum* [19].

Rola GTP-azy FtsZ i białek dynamino-podobnych w podziale mitochondriów i chloroplastów jest odmienna. FtsZ działa na wczesnym etapie podziału, gdzie prawdopodobnie wyznacza miejsce podziału, natomiast białka DRP są wymagane później, gdy organelle są już częściowo zaciśnięte i pozostaje tam aż do ukończenia podziału. Ponadto oba białka wiążą się z innymi błonami: FtsZ z błoną wewnętrzną, natomiast DRP – z zewnętrzną [24]. Z drugiej strony, mechanizm działania obu białek jest bardzo podobny: mają zdolność do oligomeryzacji oraz tworzenia pierścieni i spiral, a energia niezbędna do tego procesu pochodzi z hydrolizy GTP [16].

Pochodzenie białek dynamino-podobnych biorących udział w podziale mitochondriów i chloroplastów wciąż pozostaje niejasne. Pewne wskazówki dała badaczom analiza zsekwencjonowanego genomu pierwotniaka *Giardia intestinalis*. *Giardia* wtórnie utraciła mitochondrium, ale ma pojedynczy gen kodujący białko dynamino-podobne zlokalizowane w obrębie wewnątrzkomórkowych struktur pęcherzykowych w przeciwieństwie do innych niższych organizmów eukariotycznych, które mają mitochondrialne białka DRP [24]. Natomiast w genomie pasożyta *Trypanosoma* istnieje pojedynczy

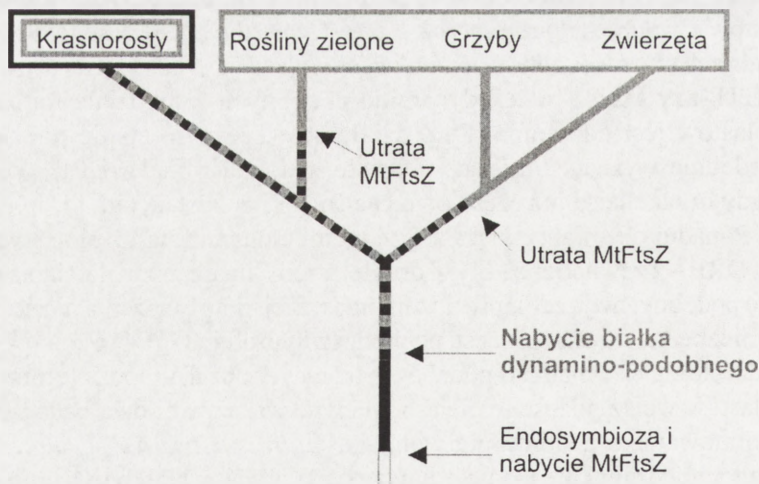
gen kodujący białko dynamino-podobne biorące udział w podziale mitochondriów [20]. Wydaje się więc, że przodek organizmów eukariotycznych miał pojedyncze białko DRP, z którego, w wyniku duplikacji genów, powstały rodziny białek DRP biorące udział w podziale organelli i innych procesach w komórce [24].

Białka dynamino-podobne mają swoje strukturalne i ewolucyjne odpowiedniki w organizmach prokariotycznych, z których być może wyewoluowały [24]. Z drugiej strony, endosymbiotyczne bakterie mogły wykorzystać endocytotyczny szlak zależny od dynaminy do wniknięcia przez błonę komórkową gospodarza, a następnie zaczęły używać dynaminy również do podziału [18]. Obserwacje te wskazują na istotną rolę białek dynamino-podobnych w ewolucji organizmów eukariotycznych.

U glonów najlepiej poznano i opisano mechanizm podziału mitochondriów i chloroplastów u krasnorosta *Cyanidioschyzon merolae*. *C. merolae* ma jedno mitochondrium i jeden chloroplast, które dzielą się synchronicznie podczas cykli jasnego i ciemnego. W miejscach podziału mitochondriów i chloroplastów zlokalizowano struktury w kształcie pierścieni: MD i PD. Zidentyfikowano również dwa białka dynamino-podobne: CmDnm1 biorące udział w podziale mitochondriów [22] i CmDnm2 biorące udział w podziale chloroplastów [19].

## ROLA ROŚLINNYCH BIAŁEK DYNAMINO-PODOBNYCH W PODZIALE MITOCHONDRIÓW

Mechanizm podziału mitochondriów zmieniał się w toku ewolucji. Jego hipotetyczny przebieg przedstawiony jest na rycinie 2. Pierwsze organizmy eukariotyczne używały wyłącznie prokariotycznego aparatu podziałowego, którego głównym elementem było



RYCINA 2. Pochodzenie mechanizmu podziałowego mitochondriów (wg [2], zmodyfikowane). Kolorem czarnym zaznaczono występowanie białka FtsZ pochodzenia prokariotycznego, natomiast szarym – białka dynamino-podobnego pochodzenia eukariotycznego

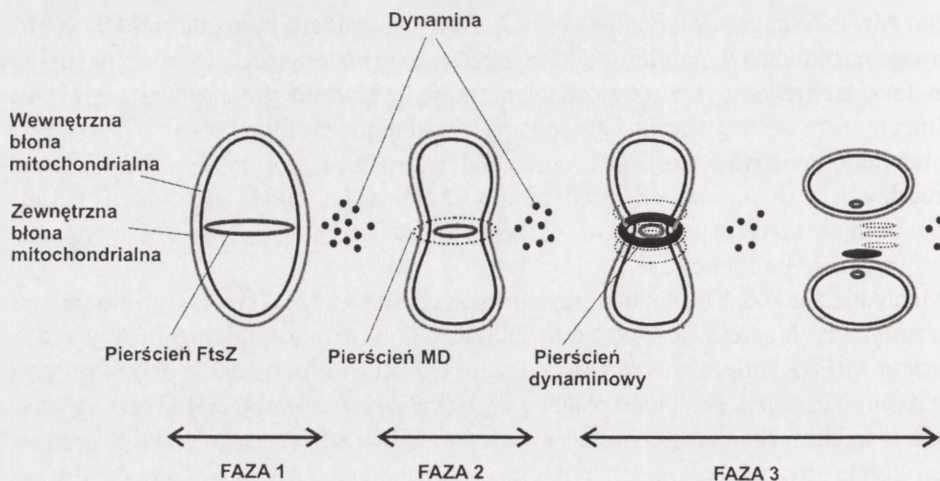


białko MtFtsZ (ang. *mitochondrial FtsZ*). Nabycie aparatu podziału mitochondriów opartego na białkach dynamino-podobnych nastąpiło bardzo wcześnie w ewolucji [31], prawdopodobnie jeszcze przed rozdzieleniem się linii ewolucyjnej zwierząt, grzybów i roślin, co może wskazywać na istnienie ich wspólnego przodka. Potwierdza to wysoki stopień podobieństwa funkcji i sekwencji białek Drp1 z *Caenorhabditis elegans*, Dnm1 z drożdży oraz dwóch białek z podrodziny DRP3 z *Arabidopsis* [2]. Poza tym inne białka biorące udział w podziale mitochondriów u zwierząt, grzybów i roślin (np. Fis1/Mdv2) są także podobne [21].

Mechanizm podziału mitochondriów u współcześnie żyjących wyższych organizmów eukariotycznych opiera się wyłącznie na białkach dynamino-podobnych. Wydaje się, że utrata MtFtsZ mogła nastąpić niezależnie w linii ewolucyjnej zwierząt i grzybów oraz roślin wyższych. Brak tego białka u wyższych organizmów eukariotycznych może wynikać z faktu, że ich mitochondria w toku ewolucji stały się bardziej dynamiczne i heterogenne i być może wykształciły niezależne mechanizmy inicjacji podziału. FtsZ mogło zostać zastąpione przez inne białka wewnątrz komórki, odpowiadające mu funkcjonalnie. Z drugiej jednak strony, wszystkie zidentyfikowane do tej pory białka dynamino-podobne biorące udział w podziale mitochondriów są związane z zewnętrzną błoną mitochondrialną, co sugeruje, że proces ten nie wymaga obecności białek związanych z wewnętrzną błoną. U mutantów drożdży niemających funkcjonalnego białka DRP siła powstająca podczas cytokinezy jest wystarczająca do podziału mitochondriów. U *C. elegans* natomiast stwierdzono, że podział wewnętrznej błony mitochondrialnej zachodzi niezależnie od podziału błony zewnętrznej. Jeśli więc istnieje mechanizm regulujący dynamikę błony wewnętrznej, to prawdopodobnie uczestniczy on raczej w tworzeniu i regulacji wewnątrzmitochondrialnych struktur błonowych niż w samym podziale mitochondriów [24].

Współcześnie istnieją organizmy eukariotyczne, które używają obu aparatów podziału mitochondriów. Należy do nich między innymi krasnorost *C. merolae*, który ma wewnętrzny pierścień FtsZ pochodzenia proteobakteryjnego oraz pierścień zewnętrzny, którego składnikiem jest prawdopodobnie białko dynamino-podobne CmDnm1 [22]. Białka podobne do FtsZ występują także u *Dictyostelium discoideum* [5]. *Dictyostelium* ma ponadto dwa białka dynamino-podobne, z których jedno wykazuje podobieństwo do Dnm1 oraz CmDnm1, niewyjaśniona jest jednak jego rola w podziale mitochondriów [37].

W pierwszej fazie podziału mitochondriów u *C. merolae* (ryc. 3) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej po stronie matriks powstaje rusztowanie utworzone przez pierścień FtsZ. Pierścień ten wyznacza miejsce podziału. Następnie po cytoplazmatycznej stronie mitochondrium powstaje pierścień MD, który zaczyna się zaciskać. W ostatniej fazie tuż przed ostatecznym podziałem mitochondrium do wnętrza zaciskającego się pierścienia MD oraz do cytoplazmatycznej powierzchni zewnętrznej błony rekrutowane jest białko dynamino-podobne CmDnm1. Pierścień dynaminowy jest wymagany tylko na ostatnim etapie podziału mitochondriów, po tym jak pierścienie FtsZ i MD zostaną zaciśnięte. Każdy z tych pierścieni spełnia odmienną funkcję, jest inaczej zlokalizowany i działa w innej fazie podziału [22].



RYCINA 3. Schemat podziału mitochondriów u krasnorostu *C. merolae* (wg [22], zmodyfikowane). W fazie 1 na wewnętrznej błonie po stronie matryks powstaje pierścień FtsZ, który wyznacza miejsce podziału. Następnie (faza 2) po stronie cytoplazmatycznej powstaje pierścień MD, który zaczyna się zaciskać. W fazie 3 tuż przed ostatecznym podziałem mitochondrium do wnętrza zaciskającego się pierścienia MD po cytoplazmatycznej stronie zewnętrznej błony przyłączane jest białko dynamino-podobne CmDnm1

Wydaje się więc, że bakteryjny typ aparatu podziałowego, którego głównym elementem była GTP-aza FtsZ, został przynajmniej częściowo zachowany w przypadku mitochondriów glonów. Genów kodujących tego typu białka nie znaleziono natomiast ani w genomie *C. elegans*, ani u drożdży. U tych organizmów w podziale mitochondriów bierze udział białko dynamino-podobne Drp1/Dnm1 zlokalizowane na zewnętrznej błonie mitochondrialnej w postaci punktowych struktur w miejscach zaciskania i podziału mitochondriów [13, 26]. U człowieka także istnieje homolog Drp1/Dnm1, który jest istotny w podziale mitochondriów [28]. Wydaje się, że rośliny wyższe również utraciły bakteryjny aparat podziału mitochondriów, a zastąpiły je białka dynamino-podobne. U *Arabidopsis* zidentyfikowano dwa białka: DRP3A (ADL2a) i DRP3B (ADL2b) wykazujące 76,7% identyczności na poziomie sekwencji aminokwasowej [1, 2]. Stwierdzono, że białko ADL2b formuje pierścienie na zewnętrznej stronie mitochondriów podczas ich podziału. Występuje w miejscach, gdzie mitochondria są zaciskane przed podziałem, a po podziale pozostaje na końcach mitochondriów [2]. Drugie białko z tej podrodziny ADL2a wykazuje podobną lokalizację wewnątrzkomórkową jak ADL2b i również uczestniczy w podziale mitochondriów [1].

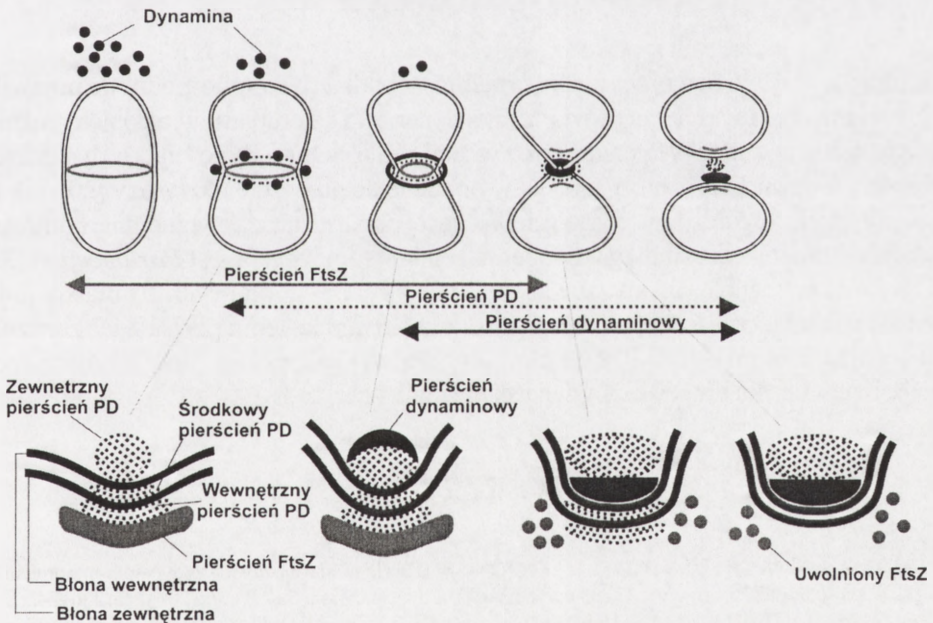
## ROLA BIAŁEK DYNAMINO-PODOBNYCH W PODZIALE CHLOROPLASTÓW

Chloroplasty dzielą się w bardzo podobny sposób jak mitochondria, jednak nie są to procesy równoważne. Podział chloroplastów może być rozumiany jako szereg kolejnych etapów, w których biorą udział różne struktury pierścieniowe o odmiennych funkcjach i pojawiające się w różnym czasie.



W toku ewolucji wiele genów wolnożyjących endosymbiotycznych cyjanobakterii, od których pochodzą chloroplasty, zostało przeniesionych do genomu jądrowego, gdzie nabyły sekwencje kodujące peptydy sygnałowe kierujące produkty tych genów z powrotem do chloroplastów [4]. U roślin zidentyfikowano pięć takich białek: FtsZ1, FtsZ2, MinD, MinE i ARTEMIS. Są one kodowane w jądrze, ale zlokalizowane w chloroplastach, gdzie uczestniczą w ich podziale. W procesie tym biorą także udział kompleksy o strukturze pierścieni PD zlokalizowane po stronie stromy wewnętrznej błony chloroplastu oraz na powierzchni cytoplazmatycznej błony zewnętrznej. W obrębie pierścienia podziałowego chloroplastów zostało zlokalizowane białko DRP5B (ARC5) u *Arabidopsis* [4] oraz jego ortolog CmDnm2 u *C. merolae* [19]. Białko ARC5 występuje na powierzchni zewnętrznej błony i tworzy pierścień na późnym etapie podziału chloroplastów. Nie ma homologów w cyjanobakterii i wydaje się, że jest pochodzenia eukariotycznego [4].

Podczas podziału chloroplastów u *C. merolae* (ryc. 4) jako pierwszy powstaje pierścień FtsZ wewnątrz chloroplastu, a następnie tworzą się pierścienie podziałowe PD, których składniki pozostają nieznane. Pierścień FtsZ znajduje się po stronie stromy wewnętrznego pierścienia PD [19]. Pierścień podziałowy (PD) składa się z 3 pierścieni: głównego, zewnętrznego po stronie cytoplazmatycznej zewnętrznej błony chloroplastów, wewnętrznego na błonie plastydowej po stronie stromy oraz środkowego w przestrzeni międzybłonowej. Podczas późnego etapu zaciskania po stronie cytoplazmatycznej



RYCINA 4. Podział chloroplastów u *C. merolae* (wg [19], zmodyfikowane). Najpierw pojawia się pierścień FtsZ wewnątrz chloroplastu. Następnie tworzy się pierścień podziałowy (PD) złożony z 3 pierścieni: zewnętrznego stanowiącego główną siłę zaciskającą, wewnętrznego oraz środkowego. Pierścień dynaminowy (utworzony przez białko CmDnm2) powstaje podczas późnego etapu podziału i przemieszcza się do przestrzeni pomiędzy zewnętrznym PD a zewnętrzną błoną chloroplastu. Na ostatnim etapie podziału pierścienie FtsZ oraz środkowy i wewnętrzny PD rozpadają się

zewnętrznego pierścienia PD powstaje pierścień dynaminowy utworzony przez białko CmDnm2, który następnie przemieszcza się do przestrzeni pomiędzy zewnętrznym pierścieniem PD a zewnętrzną błoną chloroplastu. Podczas tego etapu dochodzi również do rozpadu pierścienia FtsZ, a białko FtsZ jest przesuwane z miejsca podziału w kierunku dwóch przyszłych siostrzanych chloroplastów. Tuż przed ukończeniem podziału zanika środkowy i wewnętrzny pierścień PD. Pierścień zewnętrzny pozostaje pomiędzy siostrzanymi chloroplastami, natomiast pozostałości po pierścieniu dynaminowym przyczepiają się do każdego z nich. Z wszystkich 5 pierścieni tylko zewnętrzny pierścień PD istnieje podczas całego procesu zaciskania, które rozpoczyna się tuż po jego utworzeniu. Wydaje się, że to właśnie zewnętrzny pierścień PD najprawdopodobniej jest związany z powstaniem siły zaciskającej na wczesnym etapie podziału chloroplastu [18, 19].

Wykrycie białek dynamino-podobnych: ARC5 u *Arabidopsis* i jego homologu u *C. merolae*, które są zlokalizowane na zewnętrznej błonie chloroplastów i biorą udział w późnych etapach podziału, podobnie jak mitochondrialne białka dynamino-podobne, wskazuje, że mechanizm podziałowy chloroplastów jest częściowo pochodzenia prokariotycznego, a częściowo eukariotycznego oraz świadczy o wzajemnej ewolucyjnej korelacji pomiędzy podziałem chloroplastów i mitochondriów.

## PODSUMOWANIE

Z punktu widzenia ewolucyjnego dynaminy i białka dynamino-podobne pojawiły się jako elementy mechanizmu podziału mitochondriów i chloroplastów, a dopiero później przejęły funkcje endocytotyczne. Taką właśnie rolę pełni jedyne białko dynamino-podobne u *Trypanosoma*, które nie jest wymagane do procesu endocytozy [20], jak to jest w przypadku organizmów wyższych. Jak do tej pory najstarszą ewolucyjnie komórką, w której dynamina uczestniczy w procesach endocytotycznych, jest *Paramecium* [33, 35], u którego stwierdziliśmy obecność dwóch genów kodujących to białko [34]. *Paramecium* jako orzęsek wyewoluowało około 1,5 mld lat temu [29], a więc znacznie później niż Kinetoplastida [30], do których należy *Trypanosoma*, oraz jeszcze przed wyodrębnieniem się linii ewolucyjnej roślin i zwierząt.

## LITERATURA

- [1] ARIMURA S, AIDA GP, FUJIMOTO M, NAKAZONO M, TSUTSUMI N. *Arabidopsis* dynamin-like protein 2a (ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 236–242.
- [2] RIMURA S, TSUTSUMI N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 5727–5731.
- [3] DOMBROWSKI JE, RAIKHEL NV. Isolation of a cDNA encoding a novel GTP-binding protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 1121–1126.
- [4] GAO H, KADIRIAN-KALBACH D, FROEHLICH JE, OSTERYOUNG KW. ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4328–4333.



- [5] GILSON PR, YU XC, HERELDD, BARTH C, SAVAGE A, KIEFEL BR, LAY S, FISHER PR, MARGOLIN W, BEECH PL. Two *Dictyostelium* orthologs of the prokaryotic cell division protein FtsZ localize to mitochondria and are required for the maintenance of normal mitochondrial morphology. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 1315–1326.
- [6] GU X, VERMA DPS. Phragmoplastin, a dynamin like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J* 1996; **15**: 695–709.
- [7] GU X, VERMA DPS. Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division. *Plant Cell* 1997; **9**: 157–169.
- [8] HONG Z, BEDNAREK SY, BLUMWALD E, HWANG I, JURGENS G, MENZEL D, OSTERYOUNG KW, RAIKHEL NV, SHINOZAKI K, TSUTSUMI N, VERMA DP. A unified nomenclature for *Arabidopsis* dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 261–265.
- [9] HONG Z, GEISLER-LEE CJ, ZHANG Z, VERMA DP. Phragmoplastin dynamics: multiple forms, microtubule association and their roles in cell plate formation in plants. *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 297–312.
- [10] JIN JB, KIM YA, KIM SJ, LEE SH, KIM DH, CHEONG GW, HWANG I. A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**: 1511–1526.
- [11] KANG BH, BUSSE JS, BEDNAREK SY. Members of the *Arabidopsis* dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell* 2003; **15**: 899–913.
- [12] KANG BH, BUSSE JS, DICKEY C, RANOUR DM, BEDNAREK SY. The *Arabidopsis* cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1AP, is required for multiple stages of plant growth and development. *Plant Physiol* 2001; **126**: 47–68.
- [13] LABROUSSE AM, ZAPPATERA MD, RUBE DA, VAN DER BLIEK AM. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 1999; **4**: 815–826.
- [14] LAM BC, SAGE TL, BIANCHI PL, BLUMWALD E. Regulation of ADL6 activity by its associated molecular network. *Plant J* 2002; **31**: 565–576.
- [15] LEE SH, JIN JB, SONG J, MIN MK, PARK DS, KIM YW, HWANG I. The intermolecular interaction between the PH domain and the C-terminal domain of *Arabidopsis* dynamin-like 6 determines lipid binding specificity. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31842–31849.
- [16] MARGOLIN W. Organelle division: Self-assembling GTPase caught in the middle. *Curr Biol* 2000; **10**: R328–R330.
- [17] MIKAMI K, IUCHI S, YAMAGUSHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel *Arabidopsis thaliana* dynamin-like protein containing the pleckstrin homology domain. *J Exp Bot* 2000; **51**: 317–318.
- [18] MIYAGISHIMA SY, NISHIDA K, KUROIWA T. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 432–438.
- [19] MIYAGISHIMA SY, NISHIDA K, MORI T, MATSUZAKI M, HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KUROIWA T. A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* 2003; **15**: 655–665.
- [20] MORGAN GW, GOULDING D, FIELD MC. The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 10692–10701.
- [21] MOZDY AD, MCCAFFERY JM, SHAW JM. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 2000; **151**: 367–379.
- [22] NISHIDA K, TAKAHARA M, MIYAGISHIMA SY, KUROIWA H, MATSUZAKI M, KUROIWA T. Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 2146–2151.
- [23] NISHIHAMA R, MACHIDA Y. Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 507–512.
- [24] OSTERYOUNG KW, NUNNARI J. The division of endosymbiotic organelles. *Science* 2003; **302**: 1698–1704.
- [25] OSTERYOUNG KW, MCANDREW RS. The plastid division machine. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 315–333.
- [26] SHAW JM, NUNNARI J. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 178–184.
- [27] SHPETNER HS, VALLE RB. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 1989; **59**: 421–432.
- [28] SMIRNOVA E, GRIPARIC L, SHURLAND DL, VAN DER BLIEK AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 2245–2256.

- [29] SOGIN ML, ELWOOD HJ. Primary structure of the *Paramecium tetraurelia* small subunit rRNA coding region: phylogenetic relationships within the *Ciliophora*. *J Mol Evol* 1986; **23**: 53–60.
- [30] SOGIN ML, SILBERMAN JD. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol* 1998; **28**: 11–20.
- [31] VAN DER BLIEK AM. A mitochondrial division apparatus takes shape. *J Cell Biol* 2000; **151**: F1–F4.
- [32] VERMA DPS. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 751–784.
- [33] WIEJAK J, SURMACZ L, WYROBA E. Dynamin involvement in *Paramecium* phagocytosis. *Eur J Protistol* 2003; **39**: 416–422.
- [34] WIEJAK J, SURMACZ L, WYROBA E. Dynamin- and clathrin-dependent endocytic pathway in unicellular eukaryote *Paramecium*. *Biochem Cell Biol* 2004; **82**: 547–558.
- [35] WIEJAK J, SURMACZ L, WYROBA E. Dynamin-association with agonist-mediated sequestration of beta-adrenergic receptor in single-cell eukaryote *Paramecium*. *J Exp Biol* 2004; **207**: 1625–1632.
- [36] WIEJAK J, WYROBA E. Struktura i funkcja dynaminu oraz białek dynamino-podobnych. *Post Biochem* 2004; **50**: 240–247.
- [37] WIENKE DC, KNETSH ML, NEUHAUS EM, REEDY MC, MANSTEIN DJ. Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 225–243.
- [38] ZHANG Z, HONG Z, VERMA DP. Phragmoplastin polymerizes into spiral coiled structures via intermolecular interaction of two self-assembly domains. *J Biol Chem* 2000; **275**: 8779–8784.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano 07.03.2005 r.*

*Przyjęto: 14.04.2005 r.*

*ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

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



## PROTEASOMALNA DEGRADACJA BIAŁEK KOMÓRKOWYCH

### PROTEASOME-DEPENDENT DEGRADATION OF CELLULAR PROTEINS

Marcin BURY, Anna NIEMIERKO

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury,  
Akademia Medyczna w Warszawie

*Streszczenie:* Artykuł przedstawia podstawowe informacje dotyczące wewnątrzkomórkowej degradacji białek przez proteasomy z udziałem ubikwityny. Omówiono proces ubikwitynacji białek przeznaczonych do degradacji proteasomalnej oraz udział ubikwityny w procesach komórkowych niezwiązanych z proteolizą. Przedstawiono budowę proteasomów 20S, 26S i aktywatora PA700. Omówiono rolę immunoproteasomów w odpowiedzi immunologicznej oraz proteasomalną degradację białek niewyznakowanych łańcuchami ubikwityny. Przedstawiono zarys biogenezy proteasomów oraz możliwości zastosowania terapeutycznego inhibitorów proteasomów.

*Słowa kluczowe:* proteasom, immunoproteasom, ubikwityna, proteoliza, PA700, PA28, inhibitory proteasomów.

*Summary:* The article gives basic information on proteasome- and ubiquitin-dependent system of protein degradation. The ubiquitination process of proteins designated for proteasomal breakdown and ubiquitin involvement in extraproteasomal cellular events is discussed. The article explains the structure of 20S, 26S and PA700 complexes, the role of immunoproteasomes in the immune response and proteasomal proteolysis independent of ubiquitination. Moreover, it gives the outline of proteasomal biogenesis and possible clinical application of proteasome inhibitors.

*Key words:* proteasome, immunoproteasome, ubiquitin, proteolysis, PA700, PA28, proteasome inhibitors.

## WSTĘP

Degradacja białek w komórce odbywa się z udziałem proteasomów, lizosomów i proteaz cytoplazmatycznych. Początkowo przypisywano główne znaczenie degradacji z udziałem proteaz zawartych w lizosomach i endosomach późnych. Obecnie wiadomo,

że proteoliza zależna od proteasomów i ubikwityny to u *Eukaryota* główny układ degradujący białka wewnątrzkomórkowe.

Proteasomy degradują białka, które z różnych powodów powinny być usunięte z komórki. Są to białka o nieprawidłowej konformacji wywołanej zaburzeniami translacji, mutacjami, uszkodzeniem przez wolne rodniki czy temperaturę [41]. Również białka regulacyjne, jak np. cykliny [28], enzymy, jak np. fruktozo-1,6-bisfosfataza [76], czy kalmodulina [79], zostają zdegradowane po spełnieniu swej roli. Także większość peptydów prezentowanych przez cząsteczki MHC klasy I powstaje w wyniku proteasomalnej degradacji białek [46].

Przed proteolizą proteasomalną białka ulegają ubikwitynacji polegającej na przyłączeniu łańcuchów ubikwityny i są kierowane do proteasomów 26S, w których ulegają hydrolizie z uwolnieniem ubikwityny [36;65]. Zarówno proteasomy 20S, jak i 26S mogą także degradować białka, które nie zostały wyznakowane przez przyłączenie reszt ubikwityny [64].

## UBIKWITYNA I JEJ UDZIAŁ W PROCESACH WENĄTRZKOMÓRKOWYCH

Za badania nad ubikwityną i jej rolą w komórce, A. Hershko, A. Ciechanover i I. Rose otrzymali w 2004 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii.

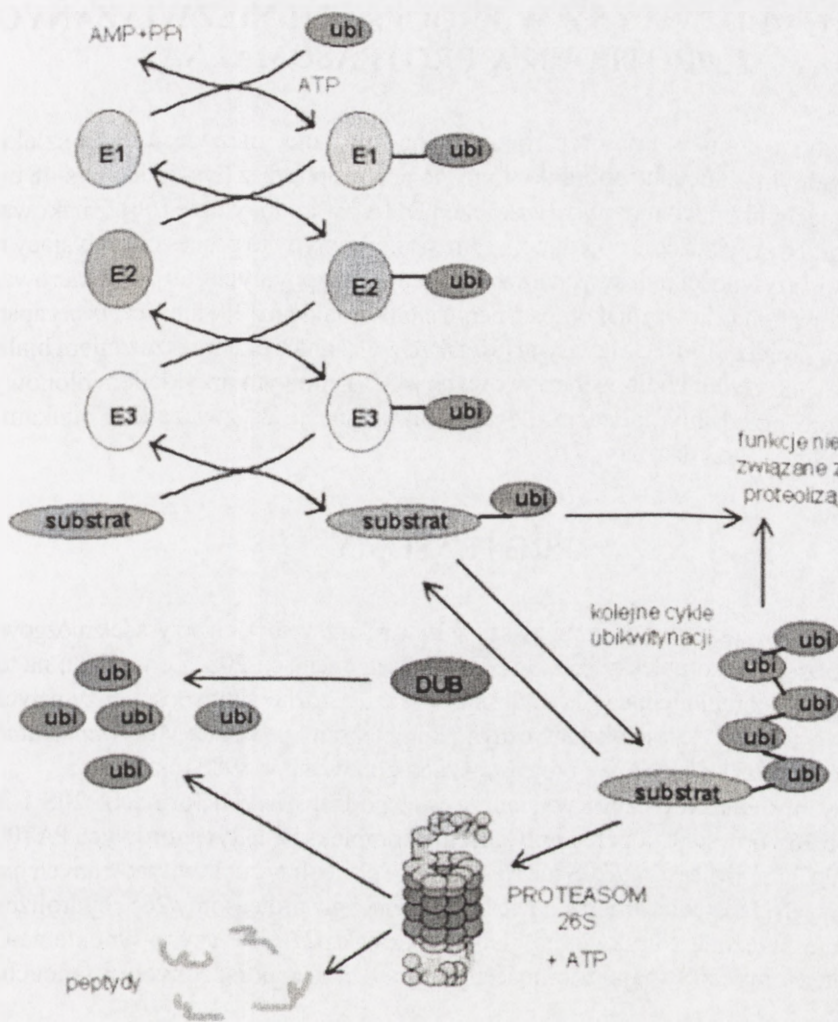
Ubikwityna to 76-aminokwasowy polipeptyd występujący we wszystkich zbadanych dotychczas komórkach i tkankach organizmów eukariotycznych. Białko to ma wysoką międzygatunkową homologię sekwencyjną. Ubikwityna drożdży różni się od ludzkiej tylko 3 resztami aminokwasowymi. Ze względu na strukturę, oprócz termostabilności ubikwitynę cechuje także odporność na proteolizę i zmiany pH [92].

Rozpoznanie substratu przez proteasom wymaga jego poliubikwitynacji poprzez przyłączanie cząsteczki ubikwityny do Lys-48 ostatniej reszty ubikwitynowej w łańcuchu [80]. Łańcuchy poliubikwityny powstają na skutek tworzenia wiązania izopeptydowego pomiędzy karboksy-końcową resztą glicyny w cząsteczce ubikwityny a końcową grupą aminową lub grupą ε-aminową w wewnętrznej reszcie lizyny białka docelowego. W reakcji transestryfikacji zależnej od ATP ubikwityna ulega aktywacji i przyłączeniu do grupy –SH reszty cysteinowej enzymu aktywującego (E1, UBA, *ubiquitin activating*) (ryc. 1). Następnie cząsteczka ubikwityny jest przenoszona na resztę cysteinową enzymu koniugującego (E2, UBC, *ubiquitin conjugating*). E2 samodzielnie lub przy pomocy enzymu zwanego ligazą ubikwitynową (E3, UBL, *ubiquitin ligase*) przenosi resztę ubikwityny na substrat. Niektóre enzymy E3, np. Rsp5, mogą modyfikować substraty poprzez przyłączenie pojedynczych cząsteczek ubikwityny, jak i jej łańcuchów [72]. Pewne substraty wymagają do swej poliubikwitynacji współdziałania czynnika elongacji łańcucha (E4) [48].

Dotychczas w komórkach ssaków opisano tylko jeden E1, około 20 E2 i bardzo wiele specyficznych substratowo E3. Taki układ pozwala na wybiórczość działania kaskady enzymatycznej związanej z ubikwitynacją [1,33].

Niekiedy białka przeznaczone do degradacji proteasomalnej, zamiast łańcuchami ubikwityny, są znakowane przez związanie z białkami adaptorowymi, np. antyzymem [13].





RYCINA 1. Schemat przedstawiający szlak proteolizy zależnej od ubikwityny i proteasomów. Enzymy E3 rozpoznają substraty i pośredniczą w przeniesieniu reszt ubikwityny (ubi) z enzymów E2, które z kolei otrzymują je poprzez transfer z E1. Zubikwitynowane substraty ulegają degradacji przez proteasomy 26S z udziałem ATP. Proteasomy uwalniają ubikwitynę i degradują substraty do krótkich peptydów. Mono- i poliubikwitynowane substraty mogą ulec deubikwitynacji dzięki działaniu enzymów deubikwitynyjących (DUB). DUB mogą także rozkładać wolne, niesprężone z substratem łańcuchy ubikwityny (wg Wójcika [92], zmodyfikowane)

Proces ubikwitynacji jest regulowany przez enzymy deubikwitynyjące (DUB). Enzymy te mają zdolność hydrolizy łańcuchów ubikwityny tworzonych przez kaskadę E1-E2-E3 zarówno uwolnionych z substratów rozłożonych przez proteasomy, jak i związanych z niezdegradowanymi białkami. W tym drugim przypadku, DUB mogą chronić substrat przed hydrolizą proteasomalną [92]. DUB mogą też skracać łańcuchy poliubikwitynowe połączone z cząsteczkami substratu [89].

## UDZIAŁ UBIKWITYNY W PROCESACH NIEZWIĄZANYCH Z PROTEOLIZĄ PROTEASOMALNĄ

Ubikwityna pełni w komórce również inne funkcje, niezwiązane ze szlakiem proteasomalnym. Łańcuchy poliubikwityny połączone poprzez Lys-63 lub Lys-48 biorą udział w mechanizmach naprawy uszkodzeń DNA i w endocytozie [66]. Znakowanie białek poprzez przyłączanie pojedynczych reszt ubikwityny to proces odgrywający rolę w regulacji aktywności jądrowych czynników transkrypcyjnych [60] oraz kierowaniu białek z błony komórkowej do kompartmentu endosomalnego [38] lub sieci *trans* aparatu Golgiego u drożdży [56]. Ubikwityna jest także związana z przemieszczaniem białek z endosomów do ciałek wielopęcherzykowych [43]. Typowym przykładem błonowych białek, które przed internalizacją ulegają ubikwitynacji, są związane z białkami G receptory Ste2 i Ste3 drożdży [71].

### PROTEASOMY

Proteasomy oczyszczono po raz pierwszy w 1980 roku z wołowych przysadek mózgowych [91]. Są to złożone kompleksy białkowe o stałej sedymentacji 20S. Ze względu na to, iż proteasomy, w obrębie jednego kompleksu, wykazują różne aktywności enzymatyczne, początkowo nazwano je wielokatalitycznymi kompleksami proteinaz MPC (*multicatalytic proteinase complex*) [91]. Nazwę proteasom zaproponowano w 1988 roku [6].

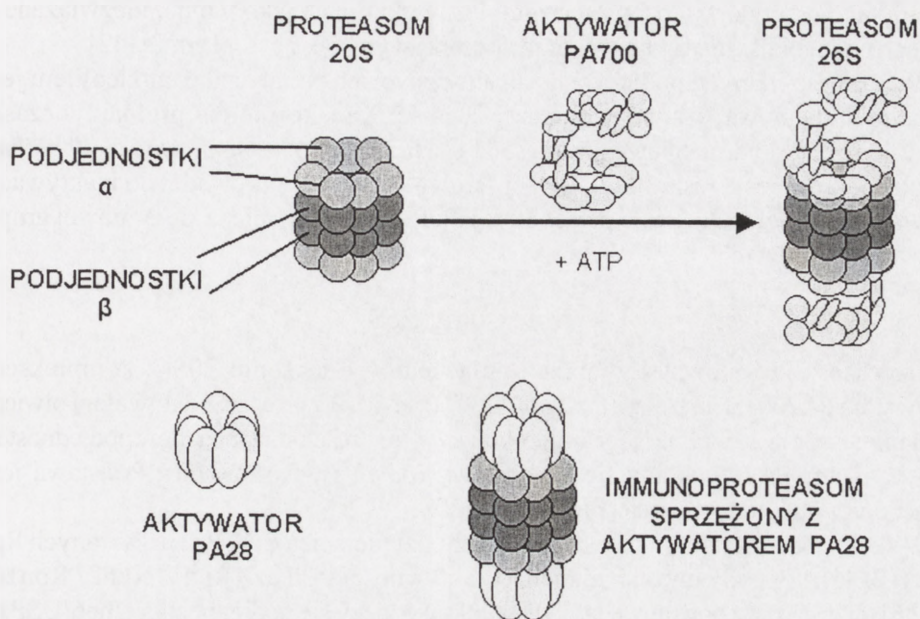
Proteasomy eukariotyczne występują w 2 podstawowych formach: 20S i 26S. Proteasom 26S powstaje poprzez przyłączenie kompleksów aktywatorowych PA700 do proteasomu 20S. Proteasomy 20S nie są zdolne do proteolizy ubikwitynowanych białek komórkowych [18], jednak mogą, nawet efektywniej niż proteasomy 26S, hydrolizować niektóre niesprzężone z ubikwityną białka, takie jak p21-GFP czy  $\alpha$ -synukleina-GFP [54]. Proteasomy 26S mają zdolność hydrolizy białek połączonych z łańcuchami ubikwityny.

Interferon  $\gamma$  indukuje w komórkach syntezę szczególnych podjednostek proteasomalnych (tzw. immunopodjednostek) oraz podjednostek aktywatora PA28 [70]. Proteasomy zawierające immunopodjednostki i połączone z kompleksami aktywatora PA28 to tzw. immunoproteasomy biorące udział w generowaniu peptydów prezentowanych limfocytom T przez cząsteczki MHC klasy I.

#### Budowa proteasomów 20S

Proteasomy 20S są zbudowane z 4 pierścieni. Każdy pierścień składa się z 7 różnych podjednostek, których masa cząsteczkowa waha się pomiędzy 20 i 35 kDa [31] (ryc. 2). Zewnętrzne pierścienie są zbudowane z 7 podjednostek  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ) każdy, a dwa pierścienie wewnętrzne – z 7 różnych podjednostek  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 7$ ). Rolę w utrzymywaniu połączenia pomiędzy pierścieniami  $\beta$  odgrywa podjednostka  $\beta 7$ . U drożdży, oddziaływanie pomiędzy karboksy-końcowym fragmentem tej podjednostki a podjednostkami  $\beta 1$





RYCINA 2. Schemat budowy proteasomu. Proteasom 20S jest złożony z 2 zewnętrznych pierścieni α i 2 wewnętrznych pierścieni β. Może połączyć się on z aktywatorem PA700, tworząc proteasom 26S. Immunoproteasomy występują w kompleksach z aktywatorem PA28

i β2 z przeciwległego pierścienia β bierze udział w stabilizacji proteasomu 20S [68]. Amino-końcowe fragmenty łańcuchów podjednostek α zamykają kanał wiodący do wnętrza proteasomu [30]. U *Thermoplasma* zwięzają one ten kanał, natomiast u drożdży i kręgowców prawie całkowicie go zamykają. Do otwarcia kanału i aktywacji proteasomu może dojść wskutek przyłączenia aktywatorów (PA700, PA28) lub chemicznie, np. pod wpływem SDS [31].

Wszystkie podjednostki α i większość β są nieaktywne enzymatycznie. Jedyne podjednostki β1, β2 i β5 mają centra aktywne [3]. Różnią się one między sobą wrażliwością na inhibitory i pH optymalnym dla swej aktywności. W badaniach *in vitro* wyróżniono 3 podstawowe aktywności proteasomu 20S: chymotrypsynopodobną (odpowiada za nią podjednostka β5), trypsynopodobną (podjednostka β2) i hydrolizującą wiązania peptydyloglutamyłowe (nazywana też aktywnością kaspazopodobną; podjednostka β1). Oprócz tego, wyróżnia się dodatkowo aktywności hydrolizujące wiązania peptydowe: rozgałęzionych aminokwasów (np. leucyny) i małych, obojętnych elektrycznie aminokwasów (np. glicyny). Są one związane z tymi samymi miejscami aktywnymi podjednostek β, co aktywności podstawowe [45,62]. Proteasom nie jest jednak zgrupowaniem niezależnych od siebie podjednostek, tylko funkcjonalną całością, w której na podjednostki katalityczne oddziałują podjednostki sąsiadujące [40]. U drożdży, karboksy-końcowy fragment podjednostki β7, tworzący kilka wiązań wodorowych z podjednostką β1 poprzez stabilizację centrum aktywnego podjednostki β1, jest konieczny dla aktywności kaspazopodobnej [68].

Jedynie podjednostka  $\alpha 5$  proteasomu jest wykrywana jako wolne, niezwiązane z proteasomem białko zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie [42].

W proteasomalnych podjednostkach aktywnych enzymatycznie, nukleofilem jest grupa hydroksylowa N-końcowej reszty Thr1 [55], a akceptorem protonu w czasie aktywacji grupy hydroksylowej jest Lys33 [4]. Na modelu *Thermoplasma acidophilum* wykazano, iż delecja reszty Thr1 lub jej zamiana na alaninę prowadzi do inaktywacji enzymatycznej i upośledzenia proteolizy [19]. Proteasomy zalicza się do nowej grupy proteaz treoninowych.

## Proteasomy 26S

Proteasom 26S powstaje poprzez połączenie proteasomu 20S z kompleksem aktywatora PA700 (*proteasome activator*) [17] (ryc. 2). Przyłączenie aktywatora otwiera kanał proteasomu 20S zamknięty amino-końcowymi częściami łańcuchów podjednostek  $\alpha$ . Aktywator PA700 składa się z podstawy (*base*) i wieczka (*lid*). Podstawa jest połączona z podjednostkami  $\alpha$  proteasomu 20S.

W skład podstawy aktywatora PA700 wchodzi pierścień 6 ATPaz nazywanych Rpt (Rpt1-Rpt6) i 3 podjednostki niemające aktywności ATPaz (Rpn1, Rpn2, Rpn10) [14;26]. U drożdży z podstawą PA700 dodatkowo łączy się podjednostka Ubp6/USP14 (*Ubiquitin Specific Proteases*; specyficzne proteazy ubikwityny) [34]. Proteasomy 20S nie wykazują aktywności ATP-azowej. Aktywność ta jest ściśle związana z aktywatorem PA700 [5], a ściślej – z jego podstawą. Wieczko PA700 jest zbudowane z niemających aktywności ATP-az podjednostek: Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12, UCH37 [27,53].

Podjednostki podstawy PA700 pełnią różnorodne funkcje. Podjednostki Rpt biorą udział w wiązaniu i rozwijaniu substratów białkowych [10]. Podjednostka Rpn10 wiąże zubikwitynowany substrat poprzez domenę UIM (*ubiquitin-interacting motif*) [21,51]. Dla wiązania przez proteasom ma znaczenie długość łańcucha ubikwityny połączonego z substratem (co najmniej 4 reszty ubikwityny). Rpt2 to podjednostka biorąca udział w otwarciu kanału proteasomu 20S zamkniętego amino-końcowymi częściami łańcuchów podjednostek  $\alpha$ . Bierze ona także udział w przemieszczaniu substratu do komory proteasomu i uwalnianiu z niej produktów [49]. Podjednostki Rpt4 i Rpt6 są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania proteasomu 26S [73]. Rpn1 oddziałuje z dwoma białkami mającymi domeny zbliżone do ubikwityny (Ubl, *ubiquitin-like domains*), Rad23 i Dsk2, które wiążą zubikwitynowany substrat i nakierowują go na proteasom. Rad23 i Dsk2 wiążą się z łańcuchami ubikwityny poprzez tzw. domenę związaną ze szlakiem ubikwityny (UBA, *ubiquitin-pathway-associated*). Wykazano, że białka mające w swej strukturze domenę UBA (jak np. produkt genu *mud1+* drożdży) mają silne powinowactwo do łańcuchów poliubikwitynowych [88].

Jak już wspomniano, wieczko aktywatora PA700 jest złożone z podjednostek: Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12, UCH37 [27,53]. Białko enzymatyczne UCH37 (*Ubiquitin C-terminal Hydrolases*; C-końcowe hydrolazy ubikwityny) tworzy kompleks z podjednostką Rpn12. UCH37 jest integralnym składnikiem PA700 u ssaków i *Drosophila*, natomiast nie stwierdza się tej podjednostki u drożdży [53]. Białko UCH37 odcina reszty ubikwityny znajdujące się na wolnym końcu łańcucha. Przypuszcza się,



że enzym ten powoli skraca łańcuch ubikwityny, co może prowadzić do uwolnienia z proteasomu białka, którego hydroliza jest z jakichś powodów opóźniona [90].

Funkcją wiezka PA700 jest rozpoznanie i odszczepienie od substratu łańcucha reszt ubikwityny. Metaloproteaza Rpn11 oraz związane z kompleksem PA700 białka UCH37, Ubp6/USP14 (*Ubiquitin Specific Proteases*; specyficzne proteazy ubikwityny) i Ubp4 (*Ubiquitin isopeptidase*; izopeptydaza ubikwityny) mają aktywność izopeptydazy, dzięki której deubikwitynują substrat częściowo zagłębiony w kanale proteasomu [25;35]. Po uwolnieniu, łańcuch ubikwityny ulega rozkładowi na pojedyncze podjednostki, które mogą wziąć udział w ubikwitynacji kolejnej cząsteczki białka. Brak deubikwitynacji substratu związanego z proteasomem blokuje przemieszczanie się całości łańcucha białkowego do wnętrza proteasomu [85].

Podjednostki PA700 u ssaków, np. Rpn10, mogą występować w komórce w kilku formach, na skutek różnej potranskrypcyjnej obróbki mRNA [44].

### Immunoproteasomy i ich udział w odpowiedzi immunologicznej

Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) indukuje w komórkach syntezę podjednostek proteasomalnych (tzw. immunopodjednostek) oraz podjednostek aktywatora PA28 [70].

Immunopodjednostki to aktywne enzymatycznie  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i oraz  $\beta$ 5i, które ulegają wbudowaniu do nowo powstających proteasomów w miejsce 3 aktywnych enzymatycznie, konstytutywnych podjednostek  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 i  $\beta$ 5 [47]. Przypuszcza się, że inkorporacja immunopodjednostek powoduje dyskretne zmiany strukturalne całego kompleksu 20S, wpływając na jego aktywność hydrolityczną. Niektóre peptydy powstają jedynie wówczas, gdy ich białko prekursorowe jest degradowane przez immunoproteasomy [46].

Kolejnym składnikiem układu proteasomów indukowanym przez IFN- $\gamma$  jest kompleks aktywatora PA28, zwany też 11S [93]. Ma on masę 180–200 kDa i składa się z podjednostek  $\alpha$  oraz  $\beta$ . Prawdopodobnie jest to kompleks o składzie  $\alpha_3\beta_4$  [46]. W skład kompleksu PA28 może też wchodzić podjednostka  $\gamma$ , wykrywana głównie w jądrze komórkowym [8,24]. Przypuszcza się, że PA28 $\gamma$  wpływa na ilość biologicznie aktywnych peptydów w jądrze komórkowym [87]. Aktywator PA28 łączy się z pierścieniami  $\alpha$  proteasomu 20S w sposób niezależny od ATP (ryc. 2). Przyłączenie aktywatora prowadzi do otwarcia kanału proteasomu 20S zamkniętego amino-końcowymi częściami łańcuchów podjednostek  $\alpha$  [86]. Przyłączenie PA28 do proteasomu aktywuje hydrolizę peptydów i nie ma wpływu na hydrolizę białek [92]. Połączenie z PA28 zwiększa powinowactwo do substratu i nie zmienia maksymalnej aktywności kompleksu enzymatycznego. Aktywność proteasomu wzrasta dzięki zwiększeniu pobierania substratu lub uwalniania produktu [78].

Immunoproteasomy będące w kompleksie z PA28 są głównym źródłem prekursorów peptydów, które łączą się z cząsteczkami MHC klasy I i są przez nie prezentowane limfocytom T. Prekursory te składają się z 10–12 reszt aminokwasowych, które w świetle szorstkiej siateczki śródplazmatycznej ulegają skróceniu przez aminoogzo-peptydazy do 8–10-aminokwasowych peptydów łączących się poprzez sekwencje kotwiczące z rowkami w cząsteczkach MHC I [59].

Tripeptydyl peptydaza II i kilka innych oligopeptydaz mogą również generować peptydy prezentowane przez MHC I, jednak najważniejszym ich źródłem są immuno-proteasomy [46].

IFN- $\gamma$  indukuje także powstanie proteasomów o mieszanym składzie, zawierających podjednostki konstytutywne i immunopodjednostki [46]. Zawartość poszczególnych typów proteasomów (konstytutywnych, mieszanych i immunoproteasomów) jest różna w różnych tkankach i narządach [15].

## BIOGENEZA PROTEASOMÓW

Biogeneza proteasomów 26S to złożony i nie do końca poznany proces. Na podstawie danych doświadczalnych można w nim wyróżnić następujące etapy: powstanie pierścienia podjednostek  $\alpha$ , prekursora 13S (zbudowanego z pierścienia podjednostek  $\alpha$  oraz podjednostek  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  i  $\beta_4$ ), prekursora 16S (zbudowanego z pierścienia podjednostek  $\alpha$  i pierścienia podjednostek  $\beta$ ), powstanie proteasomu 20S, utworzenie proteasomu 26S.

Nie jest jasne, czy pierwszym etapem biosyntezy proteasomu u *Eukaryota* jest powstanie samodzielnego pierścienia podjednostek  $\alpha$ , czy też do jego utworzenia konieczne jest współdziałanie podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , co prowadzioby do powstania prekursora 13S, z pominięciem etapu wolnego pierścienia  $\alpha$ . W ludzkich komórkach stwierdza się występowanie kompleksów o stałej sedymentacji pomiędzy 4S i 9S, złożonych co najmniej z podjednostek  $\alpha_7$  i  $\alpha_4$  [2]. Przypuszcza się, że u człowieka te właśnie podjednostki pełnią najważniejszą rolę w powstaniu pierścienia podjednostek  $\alpha$ , gdyż ich amino-końcowe fragmenty wchodzą w interakcje ze wszystkimi pozostałymi podjednostkami  $\alpha$ .

Prekursor 13S powstaje wyniku połączenia pierścienia podjednostek  $\alpha$  z 3 podjednostkami  $\beta$ :  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  i  $\beta_4$  [74]. Podjednostki  $\beta_3$  i  $\beta_4$  to jedyne, które są syntetyzowane jako dojrzałe białka bez amino-końcowej prosekwencji [61]. Do prekursora 13S wbudowują się kolejno dalsze podjednostki  $\beta$  (a właściwie – ich prekursorzy zawierające amino-końcowe prosekwencje), co prowadzi do powstania prekursora 16S. Ważną rolę w tym procesie odgrywają prosekwencje podjednostek  $\beta$  [40]. U drożdży ważną funkcją prosekwencji aktywnych enzymatycznie podjednostek  $\beta$  jest także ochrona Thr1 przed N- $\alpha$ -acetylacją ( $\alpha$ -acetylacją końcowej grupy aminowej) [4,40].

Proces dojrzewania podjednostek  $\beta$  zachodzi w czasie dimeryzacji prekursorów 16S. Prekursorzy te składają się z pierścienia podjednostek  $\alpha$  i pierścienia prekursorów podjednostek  $\beta$ . Wbudowanie ostatnich prekursorów podjednostek  $\beta$  do kompleksu 13S (czyli powstanie prekursora 16S) pobudza jego dimeryzację z innym kompleksem, co prowadzi do powstania prekursora proteasomu 20S. Jest to stadium o krótkim okresie półtrwania (sekundy), w którym zachodzi dojrzewanie podjednostek  $\beta$  poprzez odcięcie ich prosekwencji. W wyniku tego procesu powstaje dojrzały proteasom 20S [50]. Dojrzewanie aktywnych enzymatycznie podjednostek proteasomu jest dwustopniowe: najpierw sąsiednie centra aktywne skracają prosekwencje, a potem w autokatalitycznej reakcji prosekwencje są całkowicie odcinane z utworzeniem centrum aktywnego Thr1



[46]. Propeptydy nieaktywnych enzymatycznie podjednostek  $\beta$  są odcinane przez aktywne podjednostki [57].

Proteasom 26S powstaje w wyniku zależnego od ATP połączenia się aktywatora PA700 z proteasomem 20S. Kompleks PA700 składa się z wielu różnych podjednostek o masie od 25 do 110 kDa. Amino-końcowe sekwencje ATP-az wchodzących w skład kompleksu zawierają domeny odpowiedzialne za ich prawidłowe umiejscowienie w kompleksie w trakcie biogenezy aktywatora PA700 [29].

Do tej pory zidentyfikowano pięć komórkowych białek opiekuńczych związanych z biogenezą proteasomów. Białka z tej grupy swoiste dla biogenezy proteasomów to UMP1 u ssaków [11] i Nob1 u drożdży [81]. Białka opiekuńcze, które nie są swoiste jedynie dla biogenezy proteasomów, to Hsp90 [39] i Blm3 u drożdży [22] oraz hsc73 u ssaków [75].

## PROTEASOMALNA DEGRADACJA BIAŁEK

### Proteasomy 20S

Proteasomy 20S stanowią większość proteasomów komórkowych. Nie są zdolne do rozkładu zubikwitynowanych białek, ponieważ w swojej budowie nie mają aktywatora PA700. Degradują natomiast niektóre peptydy oraz niezubikwitynowane białka o wadliwej strukturze przestrzennej [79,92].

Proteasomy 20S skuteczniej niż kompleksy 26S degradują niektóre białka uszkodzone przez wolne rodniki, takie jak: kalmodulina, hemoglobina, mioglobina, G6PDH (dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa; *glucose-6-phosphatase dehydrogenase*) [16,23,32].

Proteoliza niezubikwitynowanych białek przez proteasomy 20S jest możliwa dzięki różnym mechanizmom. Niekiedy sam substrat wiąże się z proteasomem, jak w przypadku białka p21<sup>Cip</sup>, które poprzez swój koniec karboksylowy łączy się z podjednostką  $\alpha$ 7 [82]. Część substratów, jak niezwinęte białka p21<sup>Cip</sup> i  $\alpha$ -synukleina same otwierają kanał proteasomu 20S, który w stanie spoczynkowym jest zamknięty na obu końcach przez amino-końcowe łańcuchy podjednostek  $\alpha$  [54]. Pewne cząsteczki niebędące substratem także mogą otwierać kanał proteasomu 20S [30]. Prawdopodobnie w ten sposób niskie stężenia histonu H3 pobudzają degradację kazeiny i lizozymu [63].

### Proteasomy 26S

Proteasomy 26S degradują przede wszystkim białka sprzężone z ubikwitiną. W trakcie tego procesu rozwijają łańcuch białkowy i przemieszczają go do wnętrza komory proteasomu z równoczesnym uwolnieniem ubikwityny do cytosolu. Za te procesy odpowiadają podjednostki aktywatora PA700. Hydrolizę wiązań peptydowych przeprowadzają aktywne enzymatycznie podjednostki  $\beta$  proteasomu.

Proteasomy 26S mają także zdolność proteolizy niektórych białek niesprzężonych z łańcuchami poliubikwityny. Przykładem jest dekarboksylaza ornitynowa. Jej powinowactwo do proteasomu 26S zwiększa się po utworzeniu dimeru z antyzymem. Cząsteczka antyzymu znajdująca się w kompleksie nie jest degradowana przez proteasom 26S i

– po proteolizie cząsteczki dekarboksylazy ornityny – może łączyć się z kolejną cząsteczką dekarboksylazy [12]. Innymi białkami ulegającymi degradacji przez proteasomy 26S bez uprzedniego wyznakowania przez łańcuchy poliubikwityny są: p53 [7], troponina C i kalmodulina [9,79], p21<sup>CIP</sup>[77].

Biologiczne znaczenie niezależnej od ubikwityny proteasomalnej proteolizy białek nie jest do końca poznane. Pełne wyjaśnienie roli tego zjawiska w fizjologii komórki wymaga dalszych badań.

## UWAGI KOŃCOWE

Proteolizę proteasomalną można zablokować licznymi inhibitorami. Najczęściej stosowane w doświadczeniach grupy inhibitorów to aldehydy peptydów (np. PSI, MG132), pochodne kwasu boronowego (np. PS341, czyli bortezomib), epoksyketony (np. epoksomycyna i eponemycyna) oraz laktacystyna i jej pochodne (np. PS-519) [94]. Inhibitory te w wielu liniach komórek nowotworowych wywołują zahamowanie cyklu komórkowego i apoptozę [67,92]. Wyniki doświadczeń na modelach zwierzęcych wskazują również, że te substancje mogłyby znaleźć zastosowanie także jako leki przeciwnowotworowe [58], hipotensyjne czy przeciwkachektyczne [91]. Niektóre inhibitory proteasomów są już obecnie w fazie badań klinicznych jako leki przeciwnowotworowe (bortezomib [52]) lub przeciwzapalne (PS-519 [20,84,95]). Należy się spodziewać, że w najbliższej przyszłości kolejne inhibitory proteasomów znajdą zastosowanie w lecznictwie.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 2003; **29** Suppl 1: 3–9.
- [2] APCHER GS, MAITLAND J, DAWSON S, SCHEPPARD P, MAYER J. The  $\alpha 4$  and  $\alpha 7$  subunits and assembly of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 2004; **569**: 211–216.
- [3] ARENDT CS, HOCHSTRASSER M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7156–7161.
- [4] ARENDT CS, HOCHSTRASSER M. Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *EMBO J* 1999; **18**: 3575–3585.
- [5] ARMON T, GANOTH D, HERSHKO A. Assembly of the 26 S complex that degrades proteins ligated to ubiquitin is accompanied by the formation of ATPase activity. *J Biol Chem* 1990; **265**: 20723–20726.
- [6] ARRIGO AP, TANAKA K, GOLDBERG AL, WELCH WJ. Identity of the 19S «prosome» particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 1988; **331**: 192–194.
- [7] ASHER G, LOTEM J, SACHS L, KAHANA C, SHAUL Y. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 13125–13130.
- [8] BARTON LF, RUNNELS HA, SCHELL TD, CHO Y, GIBBONS R, TEVETHIA SS, DEEPE GSJ, MONACO J. Immune defects in 28-kDa proteasome activator gamma-deficient mice. *J Immunol* 2004; **172**: 3948–3954.
- [9] BENAROUDJ N, TARCSA E, CASCIO P, GOLDBERG AL. The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie* 2001; **83**: 311–318.
- [10] BRAUN BC, GLICKMAN M, KRAFT R, DAHLMANN B, KLOETZEL PM, FINLEY D, SCHMIDT M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 221–226.



- [11] BURRI L, HOCKENDORFF J, BOEHM U, KLAMP T, DOHMEN RJ, LEVY F. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10348–10353.
- [12] CHEN H, MACDONALD A, COFFINO P. Structural elements of antizymes 1 and 2 are required for proteasomal degradation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 2004; **277**: 45957–45961.
- [13] COFFINO P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 188–194.
- [14] CONFALONIERI F, DUGUET M. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays* 1995; **17**: 639–650.
- [15] DAHLMANN B, RUPPERT T, KLOETZEL PM, KUEHN L. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie* 2001; **83**: 295–299.
- [16] DAVIES KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 2001; **83**: 301–310.
- [17] DeMARTINO GN, PROSKE RJ, MOOMAW CR, STRONG AA, SONG X, HISAMATSU H, TANAKA K, SLAUGHTER CA. Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem* 1996; **271**: 3112–3118.
- [18] DeMARTINO GN, SLAUGHTER CA. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22123–22126.
- [19] DITZEL L, HUBER R, MANN K, HEINEMEYER W, WOLF DH, GROLL M. Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J Mol Biol* 1998; **279**: 1187–1191.
- [20] ELLIOTT PJ, ZOLLNER TM, BOEHNCKE WH. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med* 2003; **81**: 235–245.
- [21] ELSASSER S, GALI RR, SCHWICKART M, LARSEN CN, LEGGETT DS, MULLER B, FENG MT, TUBING F, DITTMAR GA, FINLEY D. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 725–730.
- [22] FEHLKER M, WENDLER P, LEHMANN A, ENENKEL C. Bln3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep* 2003; **4**: 959–963.
- [23] FERRINGTON DA, SUN H, MURRAY KK, COSTA J, WILLIAMS TD, BIGELOW DJ, SQUIER TC. Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 2001; **276**: 937–943.
- [24] GAO X, LI J, PRATT G, WILK S, RECHSTEINER M. Purification procedures determine the proteasome activation properties of REG gamma (PA28 gamma). *Arch Biochem Biophys* 2004; **15**: 158–164.
- [25] GLICKMAN M, ADIR N. The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. *PLoS Biology* 2004; **2**: 25–27.
- [26] GLICKMAN MH, RUBIN DM, COUX O, WEFES I, PFEIFER G, CJEKA Z, BAUMEISTER W, FRIED VA, FINLEY D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 1998; **94**: 615–623.
- [27] GLICKMAN MH, RUBIN DM, FRIED VA, FINLEY D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3149–3162.
- [28] GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin is degraded by ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [29] GORBEA C, TAILLANDIER D, RECHSTEINER M. Assembly of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Mol Biol Rep* 1999; **26**: 15–19.
- [30] GROLL M, BAJOREK M, KOHLER A, MORODER L, RUBIN DM, HUBER R, GLICKMAN MH, FINLEY D. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 2000; **7**: 1062–1067.
- [31] GROLL M, HUBER R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 606–616.
- [32] GRÜNE T, MERKER K, SANDIG G, DAVIES KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **305**: 709–718.
- [33] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Oligo- i monomeryczne ligazy ubikwitynowe E3 z domeną ring finger – budowa i działanie. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 373–392.
- [34] GUTERMAN A, GLICKMAN M. Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1729–1738.
- [35] GUTERMAN A, GLICKMAN M. Deubiquitinating enzymes are IN/9trinsic to proteasome function. *Curr Protein Pept Sci* 2004; **5**: 201–211.
- [36] HARTMANN-PETERSEN R, SEEGER M, GORDON C. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 26–31.
- [37] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 425–479.
- [38] HICKE L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 195–201.

- [39] IMAI J, MARUYA M, YASHIRODA H, YAHARA I, TANAKA K. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J* 2003; **22**: 3557–3567.
- [40] JAGER S, GROLL M, HÜBER R, WOLF DH, HEINEMEYER W. Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* 1999; **291**: 997–1013.
- [41] JESENBERGER V, JENTSCH S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 112–121.
- [42] JORGENSEN L, HENDIL KB. Proteasome subunit zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer. *Mol Biol Rep* 1999; **26**: 119–123.
- [43] KATZMANN DJ, ODORIZZI CG, EMR SD. Receptor downregulation and multivesicular body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 893–905.
- [44] KAWAHARA H, KASAHARA M, NISHIYAMA A, OHSUMI K, GOTO T, KISHIMOTO T, SAEKI Y, YOKOSAWA H, SHIMBARA N, MURATA S, CHIBA T, SUZUKI K, TANAKA K. Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. *EMBO J* 2000; **19**: 4144–4153.
- [45] KISSELEV AF, AKOPIAN TN, CASTILLO V, GOLDBERG AL. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* 1999; **4**: 395–402.
- [46] KLOETZEL PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 179–187.
- [47] KLOETZEL PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPII. *Nat Immunol* 2004; **5**(7): 661–669.
- [48] KOEGL M, HOPPE T, SCHLENKER S, ULRICH HD, MAYER TU, JENTSCH S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999; **96**: 635–644.
- [49] KOHLER A, CASCIO P, LEGGETT DS, WOO KM, GOLDBERG AL, FINLEY D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 2001; **7**: 1143–1152.
- [50] KRÜGER E, KLOETZEL PM, ENENKEL C. 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* 2001; **83**: 289–293.
- [51] LAM YA, LAWSON TG, VELAYUTHAM M, ZWEIER JL, PICKART CM. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 2002; **416**: 763–767.
- [52] LENZ HJ. Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2003; **29** Suppl 1: 41–48.
- [53] LI T, DUAN W, YANG H, LEE MK, BTE MUSTAFA F, LEE BH, TEO TS. Identification of two proteins, S14 and UIP1, that interact with UCH37. *FEBS Lett* 2001; **488**: 201–205.
- [54] LIU CW, CORBOY MJ, DeMARTINO GN, THOMAS PJ. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 2003; **299**: 408–411.
- [55] LOWE J, STOCK D, JAP B, ZWICKL P, BAUMEISTER W, HUBER R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 1995; **268**: 533–539.
- [56] MAGASANIK B, KAISER CA. Nitrogen Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 2002; **290**: 1–18.
- [57] MEINERS S, HEYKEN D, WELLER A, LUDWIG A, STANGL K, KLOETZEL PM, KRÜGER E. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and *de novo* formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* 2003; **278**: 21517–21525.
- [58] MEINERS S, LAULE M, ROTHER W, GUENTHER C, PRAUKA I, MUSCHICK P, BAUMANN G, KLOETZEL PM, STANGL K. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation* 2002; **105**: 483–489.
- [59] MO XY, CASCIO P, LEMERISE K, GOLDBERG AL, ROCK K. Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *J Immunol* 1999; **163**: 5851–5859.
- [60] MURATANI M, TANSEY WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 192–201.
- [61] NANDI D, WOODWARD E, GINSBURG DB, MONACO JJ. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J* 1997; **16**: 5363–5375.
- [62] ORLOWSKI M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990; **29**: 10289–10297.
- [63] ORLOWSKI M. Selective activation of the 20 S proteasome (multicatalytic proteinase complex) by histone h3. *Biochemistry* 2001; **40**: 15318–15326.
- [64] ORLOWSKI M, WILK S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2003; **415**: 1–5.



- [65] PETERS JM. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 377–382.
- [66] PICKART CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 2001; **8**: 499–504.
- [67] PLEBAN E, BURY M, MŁYNARCZUK I, WÓJCIK C. Effects of proteasome inhibitor PSI on neoplastic and non-transformed cell lines. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 133–134.
- [68] RAMOS PC, MARQUES AJ, LONDON MK, DOHMEN RJ. Role of C-terminal Extensions of Subunits beta2 and beta7 in Assembly and Activity of Eucaryotic Proteasomes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 14323–14330.
- [69] REITS EAJ, VOS JC, GROMME M, NEFFJES J. The major substrates for TAP *in vivo* are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 2000; **404**: 744–748.
- [70] ROCK KL, GOLDBERG AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 739–779.
- [71] ROTH AF, SULLIVAN DM, DAVIS NG. A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* 1998; **142**: 949–961.
- [72] ROTIN D, STAUB O, HAGUENAUER-TSAPIS R. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 2000; **176**: 1–17.
- [73] RUSSELL SJ, GONZALEZ F, JOSHUA-TOR L, JOHNSTON SA. Selective chemical inactivation of AAA proteins reveals distinct functions of proteasomal ATPases. *Chem Biol* 2001; **8**: 941–950.
- [74] SCHMIDT M, SCHMIDTKE G, KLOETZEL PM. Structure and structure formation of the 20S proteasome. *Mol Biol Rep* 1997; **24**: 103–112.
- [75] SCHMIDTKE G, SCHMIDT M, KLOETZEL PM. Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol* 1997; **268**: 95–106.
- [76] SCHORK SM, BEE G, THUMM M, WOLF DH. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett* 1994; **349**: 270–274.
- [77] SHEAFF RJ, SINGER JD, SWANGER J, SMITHERMAN M, ROBERTS JM, CLURMAN BE. Proteasomal turnover of p21<sup>Cip1</sup> does not require p21<sup>Cip1</sup> ubiquitination. *Mol Cell* 2000; **5**: 403–410.
- [78] STOHWASSER R, SALZMANN U, GIESEBRECHT J, KLOETZEL PM, HOLZHUTTER HG. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 6221–6230.
- [79] TARCSA E, SZYMANSKA G, LECKER S, O'CONNOR CM, GOLDBERG AL. Ca<sup>2+</sup>-free calmodulin and calmodulin damaged by *in vitro* aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *J Biol Chem* 2000; **275**: 20295–20301.
- [80] THROWER JS, HOFFMAN L, RECHSTEINER M, PICKART CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; **19**: 94–102.
- [81] TONE Y, TOH E. Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 2002; **16**: 3142–3157.
- [82] TOUITOU R, RICHARDSON J, BOSE S, NAKANISHI M, RIVETT J, ALLDAY MJ. A degradation signal located in the C-terminus of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* 2001; **20**: 2367–2375.
- [83] TURNER GC, VARSHAVSKY A. Detecting and measuring cotranslational protein degradation *in vivo*. *Science* 2000; **289**: 2117–2120.
- [84] VANDERLUGT CL, RAHBE SM, ELLIOTT PJ, DAL CANO MC, MILLER SD. Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519. *J Autoimmunol* 2000; **14**: 205–211.
- [85] VERMA R, ARAVIND L, OANIA R, MCDONALD WH, YATES JR, III, KOONIN EV, DESHAIES RJ. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; **298**: 611–615.
- [86] WHITBY FG, MASTERS EI, KRAMER L, KNOWLTON JR, YAO Y, WANG CC, HILL CP. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 2000; **408**: 115–120.
- [87] WILK S, CHEN WE, MAGNUSSON RP. Properties of the nuclear proteasome activator PA28gamma (REGgamma). *Arch Biochem Biophys* 2000; **383**: 265–271.
- [88] WILKINSON CR, SEEGER M, HARTMANN-PETERSEN R, STONE M, WALLACE M, SEMPLE C, GORDON C. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 939–943.

- [89] WILKINSON KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 2000; **11**: 141–148.
- [90] WILKINSON KD. Cell biology: unchaining the condemned. *Nature* 2002; **419**: 351–353.
- [91] WÓJCIK C. Ubiquitin- and proteasome-dependent pathway of protein degradation as an emerging therapeutic target. *Emerging Therapeutic Targets* 2000; **4**: 89–111.
- [92] WÓJCIK C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* 2002; **6**: 25–48.
- [93] WÓJCIK C, DeMARTINO GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 579–589.
- [94] WÓJCIK C, Di NAPOLI M. Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: New strategies in stroke therapy. *Stroke* 2004; **35**: 1506–1518.
- [95] ZOLLNER TM, PODDA M, PIEN C, ELLIOTT PJ, KAUFMANN R, BOEHNCKE WH. Proteasome inhibition reduces superantigen-mediated T cell activation and the severity of psoriasis in a SCID-hu model. *J Clin Invest* 2002; **109**: 671–679.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 23.02.2005 r.*

*Przyjęto: 05.05.2005 r.*

*ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa;*

*e-mail: marcin\_bury@yahoo.com*



## CZY ISTNIEJE ROŚLINNY HOMOLOG ZWIERZĘCEGO PEPTYDU NATRIURETYCZNEGO?

DOES ANY HOMOLOG OF THE ANIMAL ANP EXIST IN THE PLANTS?

<sup>1</sup>Sylwia WROTEK, <sup>2</sup>Grażyna DĄBROWSKA, <sup>3</sup>Andrzej TRETYN

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, <sup>2</sup>Pracownia Genetyki i <sup>3</sup>Zakład Biotechnologii Roślin  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Streszczenie:* W latach dziewięćdziesiątych XX wieku opublikowano szereg prac sugerujących istnienie u roślin białek homologicznych do zwierzęcych peptydów natriuretycznych (NP). Przeprowadzono wiele doświadczeń wykazując m.in. różnorodny wpływ egzogennie podawanego przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) na metabolizm oraz wzrost i rozwój roślin. Badano także aktywność roślinnego immunohomologu ANP. Mimo to do tej pory nie opisano roślinnej sekwencji białkowej ani nukleotydowej, która w istotnym stopniu byłaby podobna do zwierzęcych NP. Z tego powodu na obecnym poziomie wiedzy nie można potwierdzić istnienia roślinnych homologów zwierzęcych peptydów natriuretycznych oraz kodujących je genów.

*Słowa kluczowe:* zwierzęce peptydy natriuretyczne (NP), receptory peptydów natriuretycznych, roślinne homologi peptydów natriuretycznych, ekspansyny.

*Summary:* In 1990s papers have been published suggesting the existence of an animal atrial natriuretic peptide (ANP) homologues in plant organisms. Multiple influence of exogenous atrial natriuretic peptide into plant metabolism, growth and development has been showed. Plant ANP immunohomologues has been studied as well. However, the plant nucleotide or aminoacid sequence similar to the animal NP have not yet been published. The existence of plant NP homologues to the animal natriuretic peptides and genes encoding them was not established.

*Key words:* animal natriuretic peptides, receptors of natriuretic peptides, plant homologues of natriuretic peptides, expansins.

### WSTĘP

Przez wiele lat uważano, iż rozwojem roślin, regulacją wzrostu oraz ich fizjologiczną odpowiedzią na zmiany zachodzące w środowisku kierują tylko hormony roślinne [40]. Pogląd ten zweryfikowano w latach dziewięćdziesiątych, kiedy poznano funkcje i

właściwości takich cząsteczek, jak: glukoza, kwas jasmonowy i salicylowy oraz brasinosteroidy, nodulina, systemina, fitosulfokiny [30, 53]. Wyniki badań przeprowadzonych w latach dziewięćdziesiątych sugerują, iż peptydy natriuretyczne zaangażowane u zwierząt w regulację bilansu wodnego i sodowo-potasowego mogą również odgrywać podobną rolę u roślin. Pierwszych argumentów popierających tę hipotezę dostarczyły prace Vesely'a i Giordano, na liściach i pędzie *Dracena godseffiana* przy użyciu przeciwciał skierowanych do szczytowego przedsiorkowego peptydu natriuretycznego [56]. Zidentyfikowanie ANP u roślin otworzyłoby nieograniczone możliwości farmakologicznego wykorzystania jego jako leku obniżającego ciśnienie krwi.

## RODZINA ZWIERZĘCYCH PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH

Ponad 20 lat temu de Bold odkrył peptyd natriuretyczny produkowany w sercu szczura [11]. Początkowo zidentyfikowano i badano ANP – przedsiorkowy peptyd natriuretyczny i BNP – mózgowy peptyd natriuretyczny [34]. Następnie wyizolowano z mózgu peptyd natriuretyczny typu C – CNP [47], z aorty węgorka i pstrąga – VNP tzw. komorowy peptyd natriuretyczny [51] oraz DNP z jadu zielonej mamba [44]. Ponadto białka reagujące z przeciwciałami do ANP wykryto u ślimaka [41], kraba [55], ostrygi [59], pantofelka [57].

Do rodziny białek o właściwościach natriuretycznych należą także: urodylatyna produkowana w komórkach okołocewkowych [10], uroguanylina produkowana w śluzówce jelit [16] oraz limfoguanylina produkowana w nerkach, mięśniu sercowym i układzie immunologicznym [12].

## ANP NAJLEPIEJ POZNANYM PRZEDSTAWICIELEM RODZINY PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH

Gen kodujący ludzkie ANP znajduje się na I chromosomie w położeniu 36,21 cM. Gen ten składa się z trzech egzonów i dwóch intronów, a jego długość wynosi 1786 nukleotydów. Fizjologicznie aktywne ANP jest produktem trzeciego egzonu (1.061–1.141) [NCBI, gi 178635].

Prepro-ANP jest 152-aminokwasowym białkiem magazynowanym w przedsiorku serca. Przy udziale proteazy sygnałowej odcinana jest 24-aminokwasowa sekwencja sygnałowa z N-końca, a następnie usunięte zostają 2 argininy z C-końca probiałka (ryc. 1). Przed sekrecją peptyd ten ulega ograniczonej proteolizie na 2 cząsteczki: fragment N-końcowy (1–99aa) (aa – reszty aminokwasowe) i C-końcowy (99–126aa) [52]. Aktywną biologicznie częścią C-końca jest 17-aminokwasowy fragment zawarty pomiędzy dwiema cysteinami (7 i 23 aa) połączonymi mostkami dwusiarczkowymi. W obrębie tej pierścieniowej struktury znajdują się trzy konserwatywne sekwencje aminokwasowe: CFG-DRI-SGLGC [52]. Zniszczenie trójwymiarowej konformacji przez zerwanie mostków dwusiarczkowych powoduje zanik aktywności omawianego peptydu [32]. Dalsza proteoliza fragmentu N-końcowego pozwala



uzyskać kilka mniejszych fragmentów, z których część może również pełnić funkcje biologiczne (ryc. 1). Sugeruje się, że:

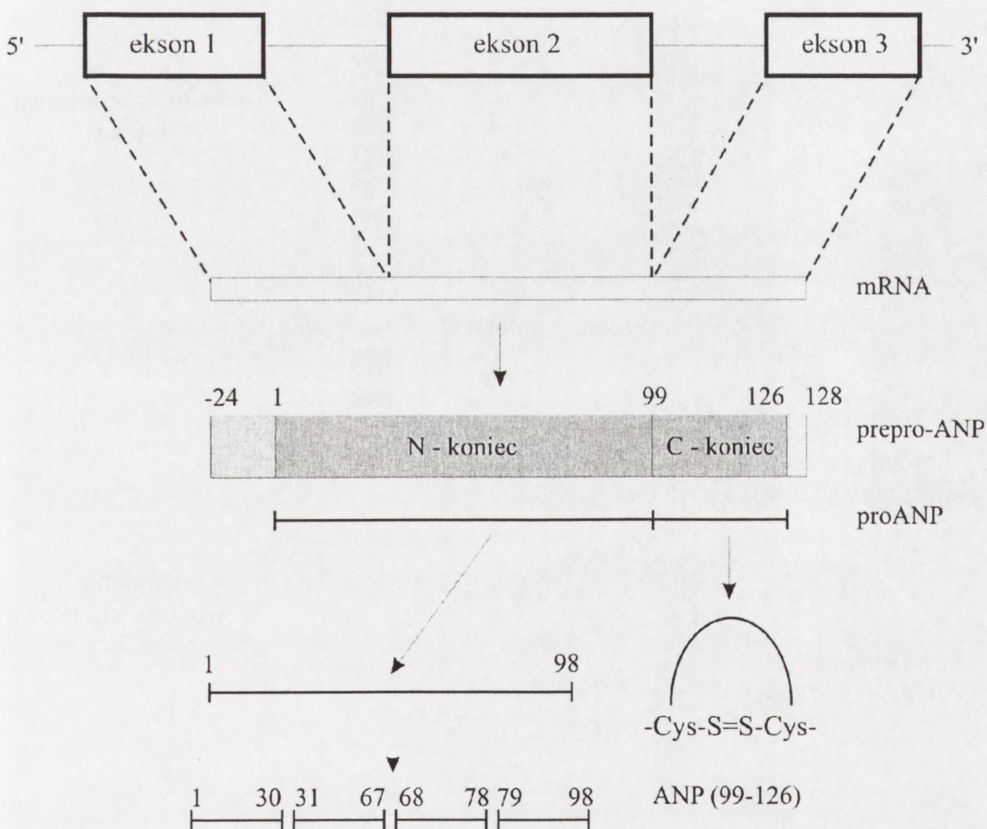
◆ ANP (1-30aa) bierze udział w długotrwałej stymulacji wydzielania sodu z organizmu,

◆ ANP (31-67aa) wpływa na rozszerzanie naczyń krwionośnych (tzw. wazodylator),

◆ ANP (79-98aa) jako tzw. białko kaliuretyczne reguluje gospodarkę potasową [60].

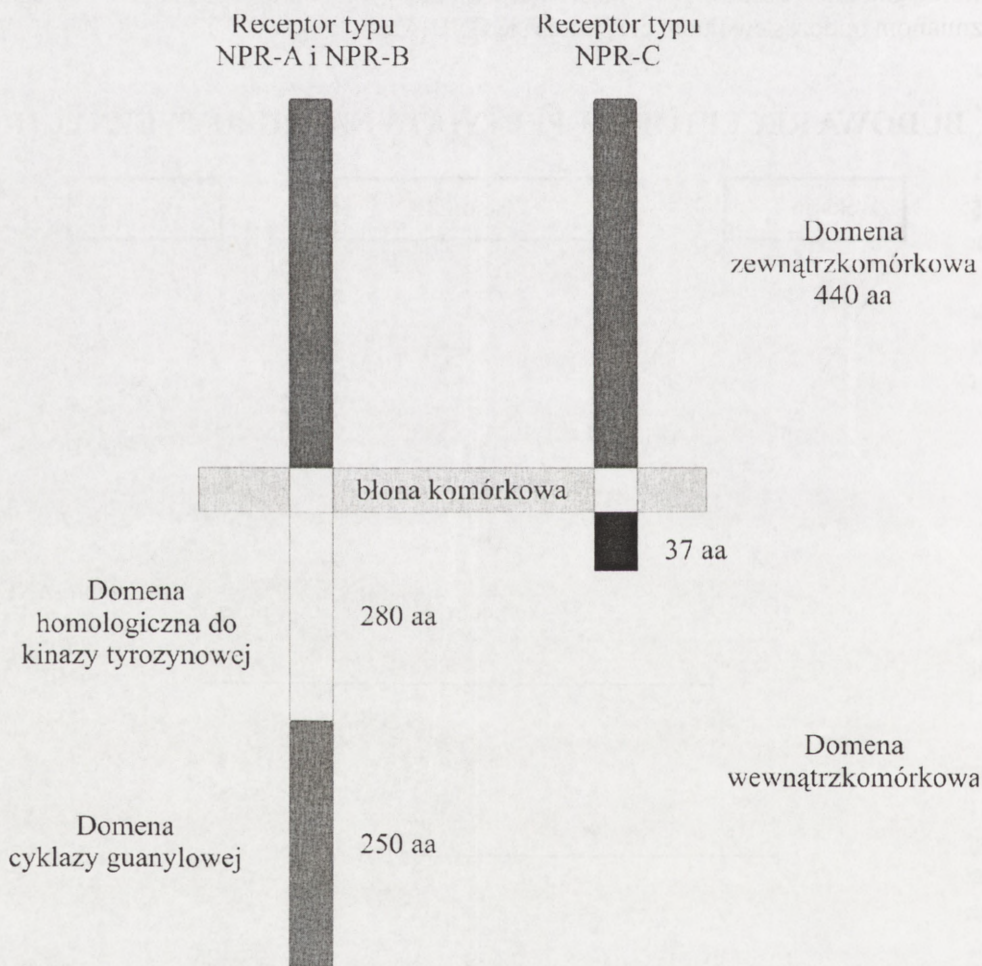
ANP jest konserwatywny wśród wszystkich gatunków ssaków. Natomiast homologia pomiędzy różnymi grupami kręgowców jest raczej niska i wynosi około 50%. Podobieństwo N-końca, tj. ANP 1-98aa człowieka i ANP 1-94aa łososia wynosi tylko 20%. Z kolei C-koniec (ANP 99-126aa) jest bardziej konserwatywny – u człowieka i łososia ich podobieństwo wynosi 63%. BNP jest wysoce zmiennym peptydem nawet wśród gatunków ssaków. Natomiast za peptyd, który w najmniejszym stopniu podlegał zmianom podczas ewolucji, przyjmuje się CNP [52].

## BUDOWA RECEPTORÓW PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH



RYCINA 1. Synteza przedsiorkowego peptydu natriuretycznego (ANP), dokładny opis w tekście

Wszystkie receptory peptydów natriuretycznych zbudowane są z pojedynczego polipeptydu zawierającego domeny: zewnątrzkomórkową (N-końcową) o długości 440 aminokwasów, transbłonową i cytoplazmatyczną (C-końcową) (ryc. 2) Receptory peptydów natriuretycznych można podzielić na 2 typy: o domenę cytoplazmatycznej mającej długość 530 aminokwasów oraz o domenę cytoplazmatycznej długości 37 aminokwasów. W domenie cytoplazmatycznej receptorów pierwszego typu można wyróżnić sekwencje homologiczne do kinazy tyrozynowej (o długości 280 aminokwasów) i cyklazy guanylowej (o długości 250 aminokwasów). Taką budowę mają receptory: NPR-A (ang. *natriuretic peptide receptor type A*) wykazujący duże powinowactwo do ANP, BNP i VNP oraz NPR-B wykazujący powinowactwo do CNP i VNP [1,



RYCINA 2. Budowa receptorów peptydów natriuretycznych



22]. Przyłączenie powyższych ligandów do receptorów prowadzi do konwersji GTP w cGMP [27]. Natomiast receptory NPR-C [25] i niedawno odkryty NPR-D, których domena cytozolowa ma 37 aminokwasów (brak tu domeny cykazy guanylowej i kinazy tyrozynowej) prawdopodobnie oddziałują z cyklazą adenylanową [52, 54]. NPR-C wykazuje powinowactwo do wszystkich peptydów natriuretycznych i uważa się, że jest jednym z czynników zmniejszających stężenie ANP we krwi [27]. NPR-D znaleziony został jedynie u węgorza (*Anquilla japonica*) [52].

Receptory związane z cyklazą guanylową w warunkach nieredukujących występują jako tetrametry. NPR-C niemający domeny cykazy guanylowej jest w tych warunkach dimerem, zaś NPR-D również bez domeny cykazy guanylowej jest teramerem – podobnie jak NPR-A i NPR-B [9, 52].

## FUNKCJE ANP U ZWIERZĄT

U zwierząt kręgowych w sercu zlokalizowane są baroreceptory (presoreceptory) wrażliwe na rozciąganie ścian naczyń krwionośnych. Początkowo sądzono, że regulacja ciśnienia krwi zachodzi jedynie dzięki przekazywaniu nerwami bodźców z baroreceptorów do ośrodkowego układu nerwowego. Obecnie wiadomo, że prawy przedsionek serca na skutek rozciągania wydziela hormon ANP. Jego natriuretyczne i diuretyczne działanie możliwe jest dzięki współpracy serca, mózgu i nerek. Wydzielanie ANP do krwiobiegu powoduje inhibicję wchłaniania wody i sodu przez jelito oraz stymulację wydalania ich nadmiaru przez nerki. Jednocześnie ANP wpływa na wydzielanie wazopresyny i aldosteronu [42]. Hormony te pobudzając lub hamując aktywność nerek, regulują zależnie od potrzeby organizmu bilans wody i jonów. Wynikiem tego jest obniżenie ciśnienia krwi w układzie krwionośnym i powrót organizmu do homeostazy [52].

ANP powoduje również hamowanie aktywności kanałów sodowych w rdzeniu nerek ssaków [63], a także dezaktywację  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazy [4]. Hormon ten działa [36] w różnych typach komórek oraz wspomaga wydalanie potasu [23]. Inną funkcją ANP jest aktywacja kanałów potasowych zależnych od wapnia przez zwiększenie wydzielania cGMP [46]. Wyniki badań zespołu Patila wykazują również bezpośrednią stymulację akwaporyn (kanałów wodnych) [35].

Wzrost stężenia ANP w osoczu wpływa na: wydzielanie aldosteronu, resorpcję sodu w kanalikach nerkowych oraz wzrost komórek naczyniowych [2, 17, 18, 19]. Badania na myszach dowiodły, że nadekspresja genu ANP powoduje obniżenie ciśnienia krwi [45]. Natomiast mutant myszy typu *knockout* (pozbawiony genu ANP) charakteryzował się wyższym ciśnieniem niż mysz typu dzikiego [20]. U ryb ANP pełni głównie funkcje hormonu odpowiedzialnego za wydzielanie sodu. Redukuje pragnienie i zmniejsza absorpcję sodu przez jelito węgorza żyjącego w wodzie słodkiej [52].

Stosując techniki autoradiograficzne i hybrydyzację *in situ* wykazano, że peptydy natriuretyczne i ich receptory występują licznie w mózgu, a szczególnie w regionie podwzgórza [6, 21]. Lokalizacja ta świadczy o udziale peptydów natriuretycznych w kontroli homeostazy płynów regulowanej przez ośrodkowy układ nerwowy. W badaniach

na szczurach wykazano, że peptydy natriuretyczne hamują działanie wazopresyny argininowej uwalnianej w podwzgórzu [43] i redukują pragnienie stymulowane angiotensyną II [3].

## ROŚLINNE PEPTYDY NATRIURETYCZNE

Pierwsze sugestie o możliwości występowania peptydów natriuretycznych u roślin pochodzą z pracy Vesely i Giordano (1991). Stosując przeciwciała skierowane przeciwko poszczególnym fragmentom ludzkiego ANP (1-30, 31-67, 79-98aa) odkryto obecność immunohomologów w łodygach i liściach draceny (*Dracaena godseffiana*) [56].

Zastosowanie chromatografii immunopowinowactwa, doprowadziło do wyizolowania trzech fragmentów prohormonu ANP homologicznych do: N-końca proANP (1-98aa); fragmentu środkowego proANP (31-67aa) oraz C-końcowego proANP (99-126aa). Porównywano stężenie poszczególnych fragmentów w wyizolowanych białkach z liści i łodyg draceny (*Dracaena godseffiana*) z białkami uzyskanymi z przedsiionka serca i żył szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*). Najwyższą zawartość ANP (190–240 ng/g) stwierdzono w szczurzym przedsiionku serca. Najniższe stężenie hormonu ANP zaobserwowano w ekstrakcie otrzymanym z żył 4,0–5,8 ng/g. Natomiast w liściach draceny stężenie wynosiło 120–150 ng/g, a w pędzie 96–140 ng/g. Na podstawie tych wyników Vesely i współpracownicy stwierdzili, iż u roślin zachodzi synteza peptydów homologicznych do zwierzęcego ANP. Badacze ci zasugerowali, że obecność peptydów natriuretycznych w liściach i pędzie może świadczyć o ich udziale w długodystansowym transporcie soli mineralnych [56].

Vesely i wsp. (1993) opublikowali listę gatunków, u których wykryto poszczególne immunohomologi ANP. Wśród tych organizmów znalazły się m.in.: euglena (*Euglena* sp.), bodziszek (*Geranium*), róża (*Rosa*) i sosna (*Pinus silvestris*). Ponadto autorzy ci stosując wysokosprawną chromatografię żelową (HPGPC) wykazali, że propeptydy i peptydy natriuretyczne z draceny (*Dracena godseffiana*) mają podobne masy cząsteczkowe do peptydów natriuretycznych z kręgowców. Ci sami autorzy stwierdzili również, że egzogennie podane fragmenty z ludzkiego ANP wpływają na poziom transpiracji u roślin [58].

Gehring i wsp. [13] odkryli, że syntetyczny szczurzy ANP indukuje otwieranie aparatów szparkowych u trzykrotki (*Tradescantia* sp.). Ponadto w błonie komórkowej liści i pędów zlokalizowano specyficzne miejsca wiązania znakowanego, szczurzego ANP [13, 49].

W 1998 Pharmawati i współpracownicy wykazali, że szczurzy rANP (ang. *Rat ANP*) działa na aparaty szparkowe tylko wtedy, gdy ma budowę pierścieniową. Przeprowadzenie S-karboksymetylacji powoduje powstanie liniowej cząsteczki peptydu i zahamowanie jego aktywności [37, 38]. Stwierdzono też, że działanie rANP jest hamowane w obecności inhibitorów cykazy guanylowej, takich jak: LY 83583 (6-anilino-5,8-quinolinequinone) i błękitu metylenowego. Natomiast analog cGMP (8-Br-cGMP) naśladuje wpływ rANP [37, 38].



W 1997 roku Bilington i współpracownicy wyizolowali i oczyścili roślinny immunohomolog ANP. Od tego czasu rozpoczęły się badania mające na celu poznanie funkcji roślinnego peptydu. Ustalono, że oczyszczony immunohomolog z bluszczu (*Hedera helix*) indukuje otwieranie aparatów szparkowych [5].

Pharmawati i współpracownicy wykazali, że immunoreaktywny, roślinny peptyd natriuretyczny powoduje wzrost cGMP w rdzeniu korzenia kukurydzy (*Zea mays*). Ustalili także, że LY83583 (inhibitor rozpuszczalnej cyklazy guanylowej) nie zawsze hamował powstawanie cGMP. Na tej podstawie stwierdzili, że u roślin podobnie jak u zwierząt w działaniu peptydów natriuretycznych musi pośredniczyć związana cyklaza guanylowa. Sugeruje to obecność w tkankach roślin receptorów peptydów natriuretycznych, zawierających domeny cyklazy guanylowej [37, 39]. Stwierdzono także, że S-karboksymetylacja jest reakcją odpowiadającą za dezaktywację peptydu. Liniowa postać cząsteczki nie wykazuje zdolności do otwierania aparatów szparkowych [37].

Suwestica i Ghering (1998) stosując technikę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) zbadali wpływ roślinnego immunohomologu ANP na transport wody z ksylenu do kory pierwotnej korzenia trzykrotki (*Tradescantia* sp.). Zaobserwowali istotny wzrost transportu radialnego pod wpływem tego peptydu. Natomiast w badaniach *in vitro* wykazali, że badany peptyd wiąże się do błon komórkowych w liściach trzykrotki [48].

Yang i wsp. (1996) stosując metodę radioimmunologiczną oraz wysokosprawnej chromatografii żelowej (HPGPC) wykryli w liściach i łodygach *Metasequoia* immunohomolog prohormonu ANP. W analizowanym eluacie zaobserwowali prohormon o większej masie cząsteczkowej oraz fragmenty powstałe w wyniku jego proteolizy. Autorzy przypuszczali, że ten peptyd ułatwia transport wody i soli mineralnych w kierunku wierzchołka rośliny, umożliwiając *Metasequoia* osiągnięcie znacznych wysokości [62].

W 2000 roku Maryani i współpracownicy wyizolowali roślinny homolog ANP z ziemniaka i wykazali jego wpływ na potencjał błonowy komórek liści tej rośliny [28]. Autorzy ci stwierdzili także, że ANP powoduje indukowane osmotycznie pęcznienie protoplastów otrzymanych z komórek miękiszowych ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Następnie ustalili, że oddziaływanie ANP na komórki przysparkowe zachodzi przy udziale cGMP i jest naśladowane przez analog cGMP (8-BrcGMP). Otwieranie aparatów szparkowych indukowane przez roślinny homolog ANP było hamowane, gdy frakcję białkową preinkubowano z przeciwciałami króliczymi skierowanymi na ludzkie ANP. Surowica z nieimmunizowanego królika nie wpływała na ruch szparek. Ustalili także, że dodanie 8-Br-cGMP nie powoduje zmian objętości protoplastów. Na tej podstawie stwierdzili, że w tym przypadku efekt zmian objętościowych nie jest powodowany przez cGMP i zasugerowali możliwość istnienia innych dróg przekazywania sygnału, niezależnych od cGMP [29].

Zaobserwowano także, że egzogennie podawane zwierzęce ANP wywierają różnicowany wpływ na rośliny [5, 28, 48]. Na tej podstawie zasugerowano istnienie u roślin receptora, dla którego ANP może być ligandem. Ustalono, że przypuszczalne receptory (podobnie jak receptory peptydów natriuretycznych) znajdują się w błonie komórkowej [13].

W 2002 roku opublikowano pracę o zidentyfikowaniu w genomie rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) sekwencji *AtPNP*, która koduje białko wiążące się

z przeciwciałami do ludzkiego ANP. Stwierdzono, że sekwencja nukleotydomowa genu oznaczonego jako *AtPNP* jest także podobna do transkryptu z *Citrus jambhiri* zwanego CjBAp12 o nieznannej funkcji i do genów z rodziny ekspansyn [26]. Dane te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Ceccardi, który jako pierwszy wskazał na podobieństwo CjBAp12 do ekspansyn [8] (ryc. 3).

W wyniku kontynuacji badań dotyczących immunoreaktywnego peptydu wyizolowano dwa homologi (irPNP): AtPNP-A i AtPNP-B (26). Porównanie sekwencji aminokwasowych obu białek wyizolowanych z *Arabidopsis thaliana* wykazuje konserwatywny wzór kolejności aminokwasowej. Natomiast porównując sekwencje aminokwasowe białek AtPNP-A i CjBAp12, stwierdzono homologię fragmentów  $\alpha$ -helikalnych i struktury- $\beta$  w konformacji cząsteczek [26].

Porównano także ekspansyny z irPNP (ang. *immuno reactant natriuretic peptide*). Ekspansyny to białka, które mają wspólne miejsce katalityczne z glukonazami. Oddziałują one z mikrofibryllami celulozy i powodują rozluźnienie lub osłabienie wiązań między składnikami ściany. Najważniejszą cechą białek irPNP jest brak C-końca, który jest charakterystyczny dla ekspansyn. Wynika z tego zasadnicza różnica w ich funkcji, ponieważ C-terminalna domena odpowiada za wiązanie ekspansyn z celulozową ścianą komórki roślinnej. Jest więc bardzo prawdopodobne, iż białka irPNP utraciły tę domenę, a więc i funkcję wiązania się ze ścianą komórki. Utrata funkcji, spowodowała zwiększenie mobilności białka CjBAp12, które jest obecne w liściu, choć tam nie jest syntezowane. Zaproponowano więc model molekularnej ewolucji białek irPNP. Wspólny przodek prawdopodobnie miał właściwości hydrolityczne i wiązał się ze ścianą komórkową. Z tego próbniaka w toku dalszej ewolucji powstały ekspansyny, zdolne do wiązania się ze ścianą, aczkolwiek utraciły mobilność oraz białka irPNP, których ruchliwość wzrosła w zamian za utratę możliwości wiązania się ze ścianą komórkową. Te wnioski oparte są nie tylko na strukturze białek, ale na ich funkcji w utrzymywaniu homeostazy wody i soli w roślinie [5, 14, 26]. Wskazano również na funkcję białek irPNP w transporcie przez membrany komórkowe, stymulację osmotyczno-zależnego transportu wody do protoplastów. Sugeruje się także pomimo dużej różnicy w funkcji ekspansyn i białek irPNP, ich współdziałanie w odpowiedzi komórki na stres [26].

Porównując wszystkie omawiane powyżej białka, wykazano wspólne cechy w budowie wynikające z rozmieszczenia pojedynczych aminokwasów, a także motywów 5–7-aminokwasowych, które wydają się być wysoce konserwatywne [26].

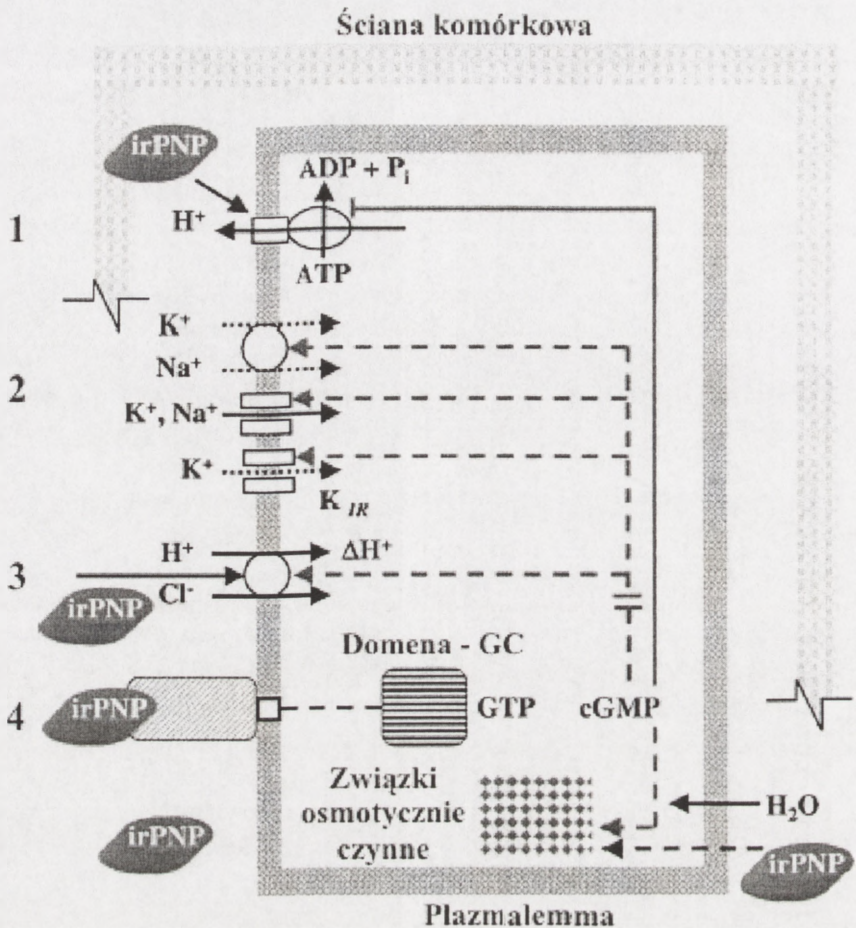
W 2003 roku Gehring i Irving opublikowali schemat stanowiący podsumowanie wiedzy dotyczącej funkcjonowania immunohomologu ANP u roślin (ryc. 4) [15].

Natomiast w następnym roku Kende i inni [24] usystematyzowali nomenklaturę białek należących do superrodziny ekspansyn. Uwzględniono również tzw. roślinne peptydy natriuretyczne, które mają domenę podobną do domeny I ekspansyn [24].



<u>Q9ZV52</u> EXR3_ARATH	<u>Expansin-related protein 3 precursor (AtEXPR3) (Ath-ExpGamma-1.2)</u> [EXLB3] [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)]	130 AA <u>align</u>
Score = 261 bits (668), Expect = 1e-69 Identities = 125/126 (99%), Positives = 126/126 (99%)		
<u>Query:</u> 1	MAVKFVVMIVFAQILAPIAEAAQ GKAVYYDPPYTRSACYGTQRET LVVGVKNNLWQNGR 60 MAVKFVVMIVFAQILAPIAEAAQ GKAVYYDPPYTRSACYGTQRET LVVGVKNNLWQNGR	
<u>Sbjct:</u> 4	MAVKFVVMIVFAQILAPIAEAAQ GKAVYYDPPYTRSACYGTQRET LVVGVKNNLWQNGR 63	
<u>Query:</u> 61	ACGRRYRVRICIGATYNFDRAC TGR TDVVKVVDVDFCREPCNGDNLNLSRDAFRV VANTDAGNI 120 ACGRRYRVRICIGATYNFDRAC TGR TDVVKVVDVDFCREPCNGDNLNLSRDAFRV +ANTDAGNI	
<u>Sbjct:</u> 64	ACGRRYRVRICIGATYNFDRAC TGR TDVVKVVDVDFCREPCNGDNLNLSRDAFRV IANTDAGNI 123	
<u>Query:</u> 121	RVVYTP 126 RVVYTP	
<u>Sbjct:</u> 124	RVVYTP 129	

RYCINA 3. Porównanie sekwencji roślinnego immunohomologu ANP pochodzącego z *Arabidopsis thaliana* z ekspansyną gamma wykonane w programie BLAST-



RYCINA 4. Wpływ roślinnego homologu ANP na zawartość jonów w komórce: 1 – pompa protonowa, 2 – różne typy kanałów jonowych, 3 – symport  $\text{Cl}^-$  i  $\text{H}^+$ , 4 – receptor roślinnego homologu ANP (irPNP) (wg [15] zmodyfikowany)

## PODSUMOWANIE

Pomimo wielu badań przeprowadzonych na roślinach zarówno występowanie ANP, jak i ich rola budzą wiele kontrowersji. Głównym argumentem przemawiającym za istnieniem roślinnych homologów ANP było wykrycie roślinnych peptydów dzięki przeciwciałom specyficznym dla fragmentu ludzkiego ANP. Ustalono, że zidentyfikowane immunoreaktywne peptydy:

- ◆ występują powszechnie u wielu gatunków roślin [58],
- ◆ są syntetyzowane w postaci probiałka, które podlega proteolitycznej obróbce prowadzącej do powstania fragmentów homologicznych do tych, jakie powstają z preprobiałka ANP [58],



◆ masy molekularne zidentyfikowanych roślinnych peptydów są zbliżone do mas zwierzęcych peptydów natriuretycznych [58],

◆ posiadają one w swojej sekwencji cysteiny połączone mostkiem dwusiarczkowym, który warunkuje aktywność biologiczną, natomiast S-karboksymetylacja białka powoduje utracenie jego aktywności [37],

◆ powodują wzrost stężenia cGMP w traktowanych nimi tkankach roślinnych [37].

Opublikowanie sekwencji immunohomologu ANP przez zespół Gehringa [29] skłania do przypuszczeń, że w tym przypadku oddziaływanie stosowanych zwierzęcych przeciwciał z ekstraktami roślinnymi jest niespecyficzne. W świetle powyższych wyników można stwierdzić, że stosowanie przeciwciał poliklonalnych do wykrywania antygenów u organizmów pochodzących z różnych królestw może prowadzić do wykrywania niepożądanych peptydów. Mimo braku homologii ANP do sekwencji roślinnego peptydu immunoreaktywnego niezmiennie stosowano nazwę „immunohomolog”. Stało się to przyczyną pojawiających się (zwłaszcza w pracach przeglądowych) błędów rzeczowych. W publikacji z 2003 roku można nawet przeczytać, że odkryto obecność genu kodującego ANP u roślin [31]. Tymczasem wykazano jedynie, że cDNA genu *ANP* z owcy hybrydyzuje z DNA i RNA bluszczu (*Hedera helix*) [61].

W 2003 roku w NCBI zdeponowano sekwencję genu określanego jako „*Immunoreactant natriuretic peptide-like protein*” (AC Q8RWA0 i Q84V62). Po wykonaniu analizy za pomocą programu BLASTP można stwierdzić, że są to peptydy najbardziej podobne do ekspansyn.

W 2004 roku zespół Gehringa opublikował pracę, w której pierwszy raz przyznano, że sekwencje tzw. immunohomologów różnią się znacząco od sekwencji ANP [33].

Zakładając, że dojrzałe peptydy natriuretyczne charakteryzują się:

◆ obecnością dwóch cystein, pomiędzy którymi tworzy się wiązanie dwusiarczkowe, nadające charakterystyczną strukturę pierścienia,

◆ obecnością 17-aminokwasowego, konserwatywnego fragmentu, w którym 11 aminokwasów jest zawsze takich samych.

Można stwierdzić, że do tej pory nie zidentyfikowano roślinnego genu kodującego peptyd, spełniający powyższe wymagania.

## LITERATURA

- [1] ALLER G, LOMBARDO I, BHANOT S, FORREST JR JN. Cloning, characterization and functional expression of a CNP receptor regulating CFTR in the shark rectal gland. *Am J Physiol* 1999; **276**: 442–449.
- [2] ANDERSON JV, STRUTHERS AD, PAYNE NN, SLATER JD, BLOOM SR. Atrial natriuretic peptide inhibits the aldosterone response to angiotensin II in man. *Clin Sci (Colch)* 1986; **70**: 507–512.
- [3] ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM, ROGERS LC, SAMSON WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8720–8723.
- [4] APERIA A, HOLTBACK U, SYREN LM, SVENSSON LB, FRYCKSTEDT J, GREENGARD P. Activation / deactivation of renal Na<sub>v</sub>, K-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J* 1994; **8**: 436–439.
- [5] BILLINGTON T, PHARMAWATI M, GEHRING CA. Isolation and immunoaffinity purification of biologically active plant natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **235**: 722–725.

- [6] BROWN J, ZUO Z. C-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide receptors of rat brain. *Am J Physiol* 1993; **264**: 513–523.
- [7] CARMELO C, LOPEZ-FARRE A, RIESCO A, OLIVERA A, OKADA K, CRAGOE E J, TSAI P, BRINGER VA, SCHRIER RW. Atrial natriuretic peptide and cGMP inhibit  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  antiporter in vascular smooth muscle cell culture. *Kidney International* 1994; **45**: 66–75.
- [8] CECCARDI TL, BARTHE GA, DERRICK KS. A novel protein associated with citrus blight has sequence similarities to expansin. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 775–783.
- [9] CHINKERS M, GARBERS DL, CHANG MS i inni. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 1989; **338**: 78–83.
- [10] CURIE MG, FOK KF, KATO J, MOORE RJ, HAMRA FK, DUFFIN KL, SMITH CE. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 947–951.
- [11] de BOLD A J, BORENSTEIN B H, VERESS AT, SONNENBERG H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; **28**: 89–94.
- [12] FORTE LR, EBER SL, FAN X, LONDON RM, WANG Y, ROWLAND LM, CHIN DT, FREEMAN RH, KRAUZE WJ. Lymphoguanilin: cloning and characterization of a unique member of guanylin peptide family. *Endocrinology* 1999; **140**: 1800–1806.
- [13] GEHRING CA, MD KHALID K, TOOP T, DONALD JA. Rat natriuretic peptide binds specifically to plant membranes and induces stomatal opening. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **228**: 739–744.
- [14] GEHRING CA. Natriuretic peptides – a new class of plant hormone? *Ann Bot* 1999; **83**: 329–334.
- [15] GEHRING CA, IRVING HR Natriuretic peptides – a class of heterologous molecules in plants. *Inter J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 1318–1322.
- [16] HAMRA FK, FORTE LR, EBER SL, PIDHORODECKYJ NV, KRAUSE WJ, FREEMAN RH, CHIN DT, TOMPKINS JA, FOK KF, SMITH CE, DUFFIN L, SIEGEL NR, CURRIE MG. Uroguanylin structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; **90**: 10464–10468.
- [17] HARRIS PJ, THOMAS D, MORGAN TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987; **326**: 697–698.
- [18] HUNT PJ, ESPINER EA, NICHOLLS MG, RICHARDS AM, YANDLE TG. Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 3871–3876.
- [19] ITOH H, PRATT RE, DZAU VJ. Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle. *J Clin Invest* 1990; **867**: 1690–1697.
- [20] JOHN S WM, KREGG JH, OLIVER PM i inni. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 1995; **267**: 679–681.
- [21] JOHNSON AK. The pre-ventricular antenotoventral third ventricle (AV3V) its relationship with the subformical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Res Bull* 1985; **13**: 595–601.
- [22] KATAFUCHI T, TAKASHIMA A, KASHIWAGI M, HAGIWARA H, TAKEI Y, HIROSE S. Cloning and expression of eel natriuretic peptide receptor B NPR-B and its comparison with the mammalian counterparts. *Eur J Biochem* 1994; **222**: 835–842.
- [23] KECSKEMETI V, PACHER P, PANKUCSI C, NANASI P. Comparative study of cardiac electrophysiological effects of atrial natriuretic peptide. *Mol Cell Biochem* 1996; **161**: 53–59.
- [24] KENDE H, BRADFORD KJ, BRUMMEL DA, CHO HT, COSGROVE DJ, FLEMING AJ, GEHRING C, MCQUEEN-MASON S, ROSE JKC, VOESENEKLA CJ. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol* 2004; **55**: 311–314.
- [25] LEVIN E R. Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am J Physiol* 1993; **264**: 483–489.
- [26] LUDIDI NN, HEAZLEWOOD JL, SEOIGHE C, IRVING HR, GEHRING CA. Expansin-like molecules: novel functions derived from common domains. *J Mol Evol* 2002; **54**: 587–594.
- [27] MAACK T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* 1992; **54**: 11–27.
- [28] MARYANI MM, SHABALA SN, GEHRING CA. Plant natriuretic peptide immunoreactants modulate plasma-membrane  $\text{H}^+$  gradients in *Solanum tuberosum* L. leaf tissue vesicles. *Arch Biochem Biophys* 2000; **376**: 457–458.
- [29] MARYANI MM, BRADLEY G, CAHILL DM, GEHRING CA. Natriuretic peptides and immunoreactants modify osmoticum-dependent volume changes in *Solanum tuberosum* L. Mesophyll cell protoplasts. *Plant Sci* 2001; **161**: 443–452.



- [30] MATSUBAYASHI Y, SAKAGAMI Y. Phytosulfokines, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7623–7627.
- [31] MINORSKY PV. The hot and the classic. *Plant Physiol* 2003; **131**: 383–384.
- [32] MISONO KS, FUKUMI H, GRAMMER RT, INAGAMI T. Rat atrial natriuretic factor: complete sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **119**: 524–529.
- [33] MORSE M, PIRONCHEWA G, GEHRING C. AtPNP is a systemically mobile natriuretic peptide immunologue with a role in *Arabidopsis thaliana* cell volume regulation. *FEBS Lett* 2004; **556**: 99–103.
- [34] MUKOYAMA M, NAKAO K, HOSODA K et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans: evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1402–1412.
- [35] PATIL RV, HAN Z, WAX M B. Regulation of water channel activity of avaporin 1 by arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 392–396.
- [36] PETROV V, AMERY A, LIJNEN P. Role of cyclic GMP in atrial-natriuretic-peptide stimulation of erythrocyte  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  exchange. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 195–199.
- [37] PHARMAWATI M, BILLINGTON T, GEHRING CA. Stomatal guard cell responses to kinetin and natriuretic peptides are cGMP dependent. *Cell Mol Life Sci* 1998a; **54**: 272–276.
- [38] PHARMAWATI M, GEHRING CA, IRVING HR. An immunofluorescence purified plant natriuretic peptide analogue modulates cGMP levels in the *Zea mays* root stele. *Plant Sci* 1998b; **137**: 107–115.
- [39] PHARMAWATI M, MARYANII MM, NIKOLAPOULOS T, GEHRING CA, IRVING HR. Cyclic GMP modulates stomatal opening induced by natriuretic peptides and immunoreactive analogues. *Plant Physiol Biochem* 2001; **39**: 385–394.
- [40] PISKORNIK Z. Fizjologia roślin dla studentów Wydż.Ogr. PWN, 1987.
- [41] REINECKE M, NEHLS M, FORSSMANN WG. Phylogenetic aspects of cardiac hormones as revealed by immunohistochemistry, electronmicroscopy, and bioassay. *Peptides* 1985; **3**: 321–331.
- [42] RUSKOAHO H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992; **44**: 479–602.
- [43] SAMSON WK, AGUILA MC, MARTINOVIC J, ANTUNES-RODRIGUES J, NORRIS M. Hypothalamic action of atria natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. *Peptides* 1987; **8**: 449–454.
- [44] SCHWARTZ H, VIGNE P, MOINIER D, FRELIN C, LAZDUNSKI M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis anguiceps*). *J Biol Chem* 1992; **20**: 13928–13932.
- [45] STEINHELPER ME, COCHRANE KL, FIELD LJ. Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 1990; **16**: 301–307.
- [46] STOCKAND JD, SAMSON SC. Role of large  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in the regulation of mesangial contraction by nitroprusside and ANP. *Am J Physiol* 1996; **270**: 1773–1779.
- [47] SUDO H, MINAMINO N, KANGAWA K, MATSUO H. C-type natriuretic peptide P. A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **168**: 863–870.
- [48] SUWASTIKA I, GEHRING CA. Natriuretic peptide hormones increase radial water movement from the xylem of *Tradescantia* shoots. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 1161–1167.
- [49] SUWASTIKA IN, TOOP T, IRVING HR, GEHRING CA. *In situ* and *in vitro* binding of natriuretic peptide hormones in *Tradescantia multiflora*. *Plant Biol* 2000; **2**: 1–3.
- [50] SZEKERS M. Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 102–104.
- [51] TAKEI Y, TAKANO M, ITAHARA Y, WATANABE TX, NAKAJIMA K, ONKLIN DJ, DUFF DW, OLSON KR. Rainbow trout ventricular natriuretic peptide: isolation, sequencing, and determination of biological activity. *Gen Comp Endocrinol* 1994; **96**: 420–426.
- [52] TAKEI T. Does the natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom? *Comp Biochem Physiol Part B* 2001; **129**: 559–573.
- [53] TAMURA N, OGAWA Y, YASODA A, ITOH H, SAITO Y, NAKAO K. Two cardiac peptide genes atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are organized in tandem in the mouse and human genomes. *J Mol Cell Cardiol* 1996; **28**: 1811–1815.
- [54] TOOP T, DONALD JA, EVANS DH. Natriuretic peptide receptors in the kidney and the ventral and dorsal aortae of the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa* (Agnatka). *J Exp Biol* 1995; **198**: 1875–1882.
- [55] TURRIN M Q A, SAWAYA MI, SANTOS MCF, VEIGA LV, MANTERO F. Atrial natriuretic peptide ANP increases in the mangrove crab *Ucides cordatus* when exposed to increased environmental salinity. *Comp Biochem Physiol* 1992; **101A**: 803–806.

- [56] VESELY DL, GIORDANO AT. Atrial natriuretic peptide hormonal system in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 695–700.
- [57] VESELY DL, GIORDANO AT. Atrial natriuretic factor-like peptide and its prohormone within single cell organisms. *Peptides* 1992; **13**: 177–182.
- [58] VESELY DL, GOWER JR. WR, GIORDANO AT. Atrial natriuretic peptides are present throughout the plant kingdom and enhance solute flow in plants. *Am J Physiol* 1993a; **265**: E465–E477.
- [59] VESELY DL, GOWER JR. WR, GIORDANO AT, FRIEDL FE. Atrial natriuretic peptides in the heart and hemolymph of the oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with vertebrates. *Comp Biochem Physiol* 1993b; **106B**: 535–546.
- [60] VESELY DL, DOUGLASS MA, DIETZ JR, GOWER JR WR, MCCORMICK MT, RODRIGUEZ-PAZ G, SCHOCKEN DD. Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce a diuresis, natriuresis and/or kaliuresis in humans. *Circulation* 1994; **90**: 1129–1140.
- [61] VESELY MD, GOWER WR, PEREZ-LAMBOY G, OVERTON RM, GRADY L, VESELY DL. Evidence for an atrial natriuretic peptide-like gene in plants. *Exp Biol Med* 2001; **226**: 61–65.
- [62] YANG Q, MATSUBAYASHI Y, NAKAMURA K, SAKAGAMI Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- $\alpha$ , a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc NATO Acad Sci USA* 1999b; **96**: 13560–13565.
- [63] ZEIDEL M L. Hormonal regulation of inner medullary collecting duct sodium transport. *Am J Physiol* 1993; **265**: F159–F173.

*Redaktor prowadzący – Maria Olkszewska*

*Otrzymano: 01.03.2005 r.*

*Przyjęto: 10.05.2005 r.*

*87-100 Toruń*

*e-mail: wrotek@biol.uni.torun.pl*



## ROŚLINNE TRANSGLUTAMINAZY\*

### PLANT TRANSGLUTAMINASES

Ewa SOBIESZCZUK-NOWICKA, Małgorzata SOLIŃSKA, Jolanta LEGOCKA

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie:* Roślinne transglutaminazy, wciąż dokładnie niesklasyfikowane, są szeroko rozpowszechnione u roślin wyższych i niższych. Ich różne izoformy zlokalizowano w różnych kompartmentach komórki, takich jak: chloroplasty, mitochondria, cytoplazma czy ściana komórkowa. Przypisuje się im udział w procesach związanych z tworzeniem się struktur komórkowych. W chloroplastach i mitochondriach dodatkowo ich rola może być związana ze specyficznym metabolizmem tych organelli. Transglutaminazy wydają się być związane z procesami wzrostowymi (cykl komórkowy, wzrost apikalny, wzrost siewek) i rozwojowymi roślin, programowaną śmiercią komórki oraz w reakcji rośliny na czynniki stresowe.

*Słowa kluczowe:* enzymy, komórka roślinna, transglutaminazy, wiązania krzyżowe białek.

*Summary:* Plant TGases, still unclassified, are widespread in higher and lower plants, in several plant organs and probably different isoforms are differently located in various cell compartments: chloroplasts, mitochondria, cytoplasm, cell walls. They probably exert a mainly structural or conformational role; however, in chloroplasts and mitochondria their roles might be related to the organelles' specific metabolisms. Transglutaminases appear related to growth (cell cycle, apical growth, seedling growth), differentiation, programmed cell death and stress.

*Key words:* enzyme, plant cell, protein cross-links, transglutaminases.

*Wykaz skrótów:* **Chl-TGaza** – chloroplastowa transglutaminaza, **PA** – poliaminy, **PCD** – programowana śmierć komórki, **PU** – putrescyna, **SD** – spermidyna, **SM** – spermina, **TGaza** – transglutaminaza, **Tyl-TGaza** – tylakoidowa transglutaminaza.

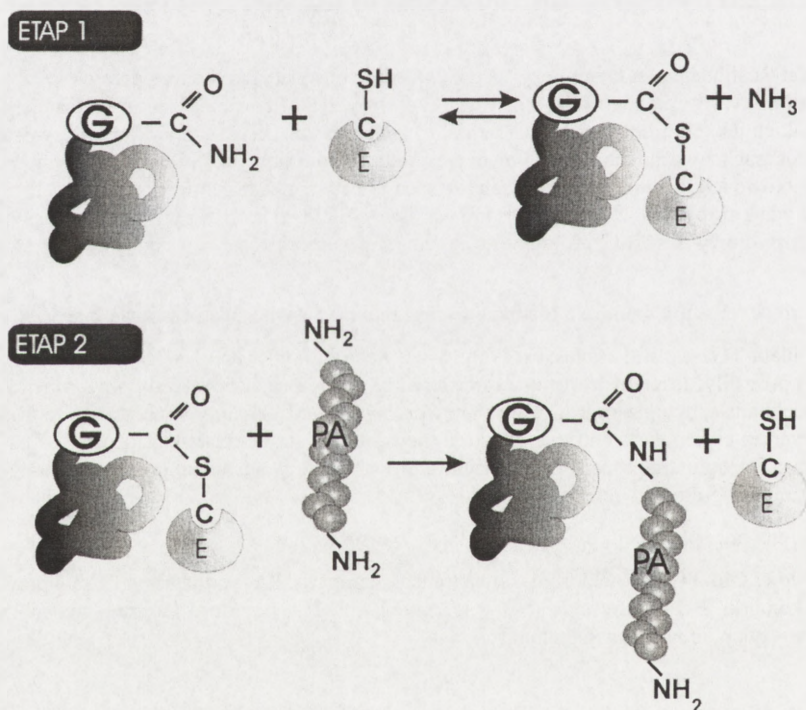
## 1. WPROWADZENIE

Wiązania krzyżowe białek, które pojawiają się jako modyfikacje potranslacyjne, są jednym z istotnych procesów zaangażowanych w stabilizację makromolekuł. Wśród

\*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 2 PO4C 085.

najlepiej poznanych wiązań krzyżowych formowanych w procesie enzymatycznej katalizy są  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lizynowe i NN-bis( $\gamma$ -glutamyl)aminowe. Formowanie się wiązań tych dwóch typów jest katalizowane przez zależne od  $\text{Ca}^{2+}$ -acylotransferazy znane jako transglutaminazy (TGazy) [EC 2.3.2.1.3] [30,32].

Transglutaminazy mają wyjątkowo szeroki zakres działania. Jednym z głównych substratów TGaz są alifatyczne poliaminy (PA), które ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne mogą być kowalentnie związane do białek w dwuetapowej reakcji [16,30,32,35]. Trzy główne poliaminy (putrescyna PU, spermidyna SD i spermina SM), są powszechnie występującymi czynnikami wzrostu i rozwoju komórki zarówno zwierzęcej, jak i roślinnej [16,27,34]. Charakteryzuje je różna liczba dodatnich ładunków (PU 2, SD 3, SM 4) i długość szkieletu (PU: 6.5Å, SD: 11.12Å, SM: 14.6Å) co wpływa na długość i wytrzymałość wiązania [16]. W pierwszym etapie do reszty glutaminy w łańcuchu białkowym jest przyłączany enzym, tworzy się kompleks enzym-białko, a z grupy  $\gamma$ -karboksamidowej reszty glutaminowej uwalniany jest amoniak. W etapie drugim w miejsce enzymu do cząsteczki białka przyłączona jest pierwszorzędowa grupa aminowa (poliaminy), a enzym jest uwalniany (ryc.1) [30,32]. Rezultatem aktywności



YCINA 1. Schemat reakcji katalizowanej przez transglutaminazy. Reakcja polega na przyłączaniu poliamin do cząsteczki białka. Przebiega w 2 etapach. W pierwszym etapie do reszty glutaminy w łańcuchu białkowym jest przyłączany enzym, tworzy się kompleks enzym-białko, a z grupy  $\gamma$ -karboksamidowej reszty glutaminowej uwalniany jest amoniak. W etapie drugim w miejsce enzymu do cząsteczki białka przyłączona jest pierwszorzędowa grupa aminowa (poliaminy), a enzym jest uwalniany (na podstawie [32], zmodyfikowane): E – enzym, PA – poliaminy, G – glutamina, C – węgiel



transglutaminaz w komórce przy współdziałaniu PA jest zmiana ładunku białka, a także zmiana jego konformacji poprzez tworzenie połączeń krzyżowych w obrębie tego samego białka (reakcja opisana powyżej) bądź pomiędzy różnymi białkami, czego konsekwencją może być formowanie się koniugatów białkowych o wysokiej masie cząsteczkowej (ryc. 2) [23,30,32].



*N*-mono ( $\gamma$ -glutamyl)-putrescyny



*N*<sup>1</sup>-mono ( $\gamma$ -glutamyl)-spermidyny



*N*<sup>8</sup>-mono ( $\gamma$ -glutamyl)-spermidyny



*N*<sup>1</sup>/*N*<sup>12</sup>-mono ( $\gamma$ -glutamyl)-sperminy



*N*-bis ( $\gamma$ -glutamyl)-putrescyny



*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>8</sup>-bis ( $\gamma$ -glutamyl)-spermidyny



*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>12</sup>-bis ( $\gamma$ -glutamyl)-sperminy

RYCINA 2. Putrescyna, spermidyna i spermina mogą być acylowymi akceptorami (substratami) w reakcji katalizowanej przez transglutaminazy. Reakcja z pierwszorzędową grupą aminową poliaminy daje mono-( $\gamma$ -glutamylowe) pochodne. Kolejno w reakcje wchodzi drugorzędowa grupa aminowa i powstają bis-( $\gamma$ -glutamylowe) pochodne. W odróżnieniu od putrescyny i sperminy, spermidyna jest asymetryczną molekułą. Spermidyna tworzy dwie konformacyjnie różne mono-( $\gamma$ -glutamylowe) pochodne (na podstawie [30], zmodyfikowane).

## 2. BIOCHEMIA ROŚLINNYCH TRANSGLUTAMINAZ

### 2.1 Charakterystyka pierwszej roślinnej transglutaminazy

Kilku oczyszczonym roślinnym białkom może być przypisana funkcja TGazy. Obecnie jednak tożsamość tych białek jest niepoznana. Dodatkowo, nie znaleziono żadnej sekwencji w bazie dla rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), kukurydzy (*Zea mays*), ryżu (*Oryza sativa* L) czy ziemniaka (*Solanum tuberosus*), zbliżonej do sekwencji zwierzęcej TGazy. To utrudnia czy nawet wyklucza możliwość zidentyfikowania roślinnej TGazy poprzez porównanie jej sekwencji z sekwencją dobrze poznanej zwierzęcej TGazy [35].

W latach dziewięćdziesiątych poza częściowo oczyszczonym białkiem o masie 39 kDa pochodzącym z chloroplastów [12] tylko Kang i inni [20] wyizolowali białko o masie 80kDa z liści soi, do tej pory zresztą niezsekwencjonowane, które charakteryzowało się, aktywnością TGazy.

Niedawno wykazano u *Arabidopsis thaliana* obecność genu *AtPng1p*, którego sekwencja zbliżona była do N-glikanazy. *AtPng1p* zawiera cysteinę, histydynę, asparaginę (Cys-His-Asp) sekwencję aminokwasów charakterystyczną dla katalitycznej domeny TGazy. W genomie *Arabidopsis thaliana*, tylko *AtPng1p* ma centrum katalityczne o tej sekwencji. Glikanazy są enzymami zaangażowanymi w degradację białek, które nie osiągnęły swojej finalnej struktury. Jako amidazy, glikanazy mają resztę cysteiny, która jest nukleofilną resztą niezbędną do aktywności enzymu [35].

*AtPng1p* jest pojedynczym genem, który ulega ekspresji na bardzo niskim poziomie, aczkolwiek występuje powszechnie w komórce. W reakcji RT-PCR określono poziom mRNA dla opisywanego genu. W całej roślinie, w różnych jej organach, w różnych stadiach rozwoju, dla różnych przebadanych w pracy warunków świetlnych poziom mRNA był zbliżony [11]. Aby wykazać, czy *AtPng1p* rzeczywiście koduje TGazę, jego sekwencja kodująca została wklonowana do *Escherichia coli*. Rekombinowane białko było następnie oczyszczone przy użyciu chromatografii powinowactwa na kolumnach niklowych. Białko o masie 86 kDa zostało zlokalizowane przy użyciu trzech przeciwciał anti-TGazowych pochodzenia zwierzęcego. Dodatkowo, analiza *Western blot* przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko rekombinowanemu białku *AtPng1p* wykazała jego obecność we frakcji mikrosomalnej *Arabidopsis thaliana*. Inne białka o niższej masie cząsteczkowej wykryto wykorzystując to samo przeciwciało do identyfikacji białek cytozolowych [11]. Nasunęło się pytanie, czy dodatkowe jednostki białkowe wykryte metodą *Western blot* mogą być wynikiem proteolitycznej degradacji białka *AtPng1p*, która ma miejsce w przypadku ekspresji TGazy pochodzenia zwierzęcego [16,25]. Rekombinowane białko, TGaza z *Arabidopsis thaliana*, włączało poliaminy (sperminę, spermidynę, putrescynę oraz biotyno-kadawerynę) do dimetylokazeiny tylko w obecności wapnia. Dodatkowo, analiza  $\gamma$ -glutamylowych pochodnych potwierdziła, że produkt genu *AtPng1p* ma aktywność  $\text{Ca}^{2+}$ -zależnej TGazy [11].

Jest to pierwsze białko roślinne, wyizolowane i scharakteryzowane na poziomie molekularnym, które ma właściwości zbliżone do enzymu zwierzęcego. Zatem można wysnuć hipotezę, że oczyszczone białko *AtPng1p*, aczkolwiek różniące się swoją



sekwencją od TGaz zwierzęcych, poza sekwencją aminokwasów w miejscu katalitycznym jest TGazą roślinną z różną historią filogenetyczną [11,35].

## 2.2. Wpływ wapnia, magnezu i grup tiolowych na aktywność enzymatyczną transglutaminaz

Wydaje się, że wewnątrzkomórkowa pula wapnia może mieć istotny wpływ na aktywność TGazy, czego konsekwencją jest włączanie PA do białek. Wiązanie się PA do białek obserwowano przy 20 nM stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce roślinnej [24]. Wcześniej obserwowano, że mikromolarne stężenie wapnia w komórce hamuje wiązanie się PA do białek [9,29]. W tych warunkach, roślinne TGazy mogą brać udział w formowaniu się wiązań typu  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lizynowych izopeptydów [24]. Lilley i inni [24] wykazali udział TGaz w tworzeniu się wiązań izopeptydowych w komórce roślinnej. Tego typu wiązania będą pojawiać się zatem w środowisku, w którym występuje wyższe stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  np. w komórkach ściany bądź gdy zmagazynowany w komórce  $\text{Ca}^{2+}$  zostanie uwolniony np. w wyniku śmierci komórki.

Wstępne wyniki badań sugerują [33], że również jony  $\text{Mg}^{2+}$  mogą być istotnym elementem regulującym aktywność głównie chloroplastowej formy TGazy i wpływają na proces tworzenia wiązań krzyżowych hamująco.

Użycie inhibitorów blokujących tworzenie się mostków dwusiarczkowych podkreśla znaczenie grup tiolowych dla aktywności chloroplastowych i zlokalizowanych w ścianie komórkowej TGaz [19]. Dithiothreitol – czynnik redukujący stymulował aktywność enzymu w liściach soi [19,20].

Podanie inhibitorów proteaz w czasie inkubacji chloroplastów ze znakowaną SD powodowało słabsze wiązanie się tej poliaminy do białek. Próby bez inhibitorów charakteryzowały się jednak lepiej zachowanymi białkami i chlorofilem [19]. Autorzy sugerują, że

a) częściowa proteoliza substratu, jakim jest kompleks LHCII, może odsłaniać miejsca dla wiązania się produktu lub

b) być może subtelna proteoliza aktywuje chloroplastową TGazę (Chl-TGazę) albo

c) inhibitory proteaz inaktywują tiolowe grupy cysteiny zlokalizowane w centrum aktywnym enzymu.

## 2.3. Wrażliwość na światło

W ostatnich latach pojawiły się pierwsze doniesienia, iż roślinne transglutaminazy są enzymami, których aktywność jest zależna od światła. Zależność tę zaobserwowano głównie w zielonych liściach, ściślej w całych chloroplastach i w ich subfrakcjach (stroma, tylakoidy) [5,9,15]. U zwierząt, u których funkcja i mechanizm reakcji TGaz jest lepiej poznany, nie zauważono, aby aktywność enzymu była regulowana światłem [16].

W różnicujących się chloroplastach, światło stymuluje jednocześnie wzrost poziomu TGazy i pojawianie się produktów reakcji, którą ten enzym katalizuje. Hipotezę tę wspierają doświadczenia prowadzone *in vitro* na etiolowanych tkankach bulwy

*Helianthus tuberosus* L. Światło zwiększało poziom TGazy w komórce, którą analizowano wykorzystując przeciwciało z prostaty szczura, wykrywające białko o masie 58 kDa [9]. W warunkach *in vivo*, światło wpływało na zwiększoną ekspresję niektórych substratów TGaz m.in. genów alfa i beta tubulin oraz kilku plastydowych białek, takich jak Rubisco czy białek kompleksów (LHCI, LHCII) i innych, co sugerowało udział tego enzymu w procesie ontogenezy plastydu [9].

Postulowano również, że nowa forma enzymu, charakterystyczna dla liści, pojawia się, kiedy etiolowane tkanki poddane są działaniu światła. Efekt ten badano w hodowli *in vitro* eksplantów (parenchyma bulwy *Helianthus tuberosus* L.) pierwotnie nie fotosyntezujących, pozbawionych zielonych plastydów i wykształconego systemu błon tylakoidowych. Eksplanty poddawano działaniu hormonów, które stymulowały lub hamowały różnicowanie się chloroplastów pod wpływem światła [5].

W toku innych badań, przeprowadzanych na kukurydzy, w reakcji ze znakowaną PU zarówno oczyszczona frakcja tylakoidów, jak i LHCII były bogate w mono- jak i bis-glutamyl-PU. Pochodne glutamylowe pojawiały się w wymienionych układach na świetle. W ciemności można było wykryć jedynie śladowe ilości tych związków [12]. Wyniki te pozwalają spekulować, że aktywność plastydowych TGaz regulowana jest przez światło. Jak donosi Della Mea i inni [12], znane, zależne od światła zmiany strukturalne LHCII powodują dwie charakterystyczne reszty glutaminy, a odległość, o jaką są oddalone, jest zbliżona do molekularnego rozmiaru SM, która może formować bis-glutamyl-SM-owe mostki.

Wspomniane reszty glutamylu, które mogą wchodzić w reakcje z PA, *in vivo* są zlokalizowane w pętli utworzonej ze światła gran, gdzie pH jest niższe niż to, w którym przebiega proces fotosyntezy i to, które jest optymalne dla aktywności enzymatycznej TGazy [9]. Testowanie TGaz pochodzenia zwierzęcego w materiale roślinnym sugeruje, że nie wszystkie reszty glutamylu LHCII są dostępne dla tych enzymów. TGazy pochodzące zarówno z erytrocytów, jak i wątroby świnki morskiej są głównie enzymami cytoplazmatycznymi, a ich hydrofilność utrudnia im funkcjonowanie w hydrofobowym środowisku LHCII. Kataliza przy użyciu tych enzymów prowadzi jedynie do otrzymania mono-pochodnych [12]. Dla kontrastu tylakoidowa transglutaminaza (Tyl-TGaza) katalizuje znaczną ilość bis-pochodnych, które można zaobserwować we frakcji izolowanych chloroplastów. Tylakoidowy enzym z powodu swojego małego rozmiaru i specyficzności działania może pełnić rolę strukturalną i mieć swój udział w stabilizacji kompleksu LHCII. Della Mea i inni [12] sugerują, że Tyl-TGaza jest zlokalizowana blisko LHCII bądź jest z nim związana. LHCII ma miejsce wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  o wysokim powinowactwie (wapń jest wykorzystywany w procesie formowania się gran) i miejsce wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  o niższym powinowactwie, być może miejsce to jest istotne dla  $\text{Ca}^{2+}$ -zależnej katalizy przeprowadzanej przez Tyl-TGazę. Podobieństwa zaobserwowane u roślin jedno- i dwuliściennych wskazują na to, że tylakoidowa forma tego enzymu jest częściowo zależna od światła. Ponadto modulowana światłem zmiana konformacji LHCII może wpływać na aktywność enzymu [12,15].



### 3. FUNKCJE ROŚLINNYCH TRANSGLUTAMINAZ

Różnice, które obserwujemy w charakterystyce TGaz w różnych organach tej samej rośliny, mogą wynikać z faktu, iż być może więcej niż jeden enzym czy różne formy tego samego enzymu są obecne w jednym organizmie [30,32]. U roślin TGazy prawdopodobnie pełnią rolę, jaką przypisuje się im w komórkach zwierzęcych. Jednak ich lokalizacja w konkretnych przedziałach komórkowych i różne substraty, które wykorzystywane są w reakcji enzymatycznej, mogą sugerować, że roślinne TGazy spełniają dodatkowe funkcje w komórce roślinnej, nieznane u zwierząt [10, 30,32]. W tabeli ujęto lokalizację enzymu w obrębie komórki roślinnej i przedstawiono biologiczną funkcję, jaką pełnią w niej TGazy. Występowanie enzymu u roślin zasugerowano wskutek

TABELA. Lokalizacja transglutaminaz i ich udział w procesach morfologicznych i fizjologicznych rośliny (na podstawie [10], zmieniono)

FUNKCJA BIOLOGICZNA	ORGANIZM	ORGAN, TKANKA, ORGANELLA	LITERATURA
Podziały komórkowe	<i>Helianthus tuberosus</i> <i>Dunaliella salina</i>	parenchyma, merystem wierzchołkowy całe komórki	[30] [29] [13,14]
Wzrost apikalny	<i>Malus domestica</i> <i>Candida albicans</i>	pyłek grzybnia	[8] [28]
Rozwój/Różnicowanie	<i>Helianthus tuberosus</i> <i>Zea mays</i> <i>Vicia faba</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Physarium</i> sp. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	kallus jw. liście/korzenie jw. jw. wzrost ściana komórkowa k. wegetatywne, zygota	[5] [1]   [24] [11] [21] [36]
Fotosynteza/Fotoprotekcja	<i>Beta vulgaris</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Helianthus tuberosus</i> <i>Glycine max</i> <i>Helianthus tuberosus</i> <i>Dunaliella salina</i> <i>Zea mays</i> jw.	liście pączki kwiatów chloroplasty/liście liście/siewki stroma/tylakoidy chloroplasty chloroplasty, grana kompleks LHCII	[33] [26] [6,7,9] [19] [15,] [13,14] [37] [12]
Odpowiedź na stres	<i>Dunaliella salina</i>	komórki	[13]
Magazynowanie białek	<i>Glycine max</i>	liścienie	[21]
Programowana śmierć komórki	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Phaseolus aureus</i>	płatki kwiatów mitochondria jw.	[31] [38]

wykrycia PA związanych z białkami. Bezpośrednim dowodem na to, że TGaza jest odpowiedzialna za tego typu koniugację, była izolacja cząsteczek glutamyl-PA [5].

TGazy roślinne po raz pierwszy zidentyfikowano w dzielących się komórkach, takich jak etiolowany merystem wierzchołkowy, czy podczas analizy cyklu komórkowego [29, 30]. Podczas synchronicznego cyklu komórkowego w komórkach parenchymy *Helianthus tuberosus* L., zaobserwowano niską aktywność TGazy we wczesnej fazie G1 cyklu, która wzrastała podczas fazy S [30]. Równolegle zaobserwowano włączanie PA do białek o wysokiej masie cząsteczkowej (58 kD i 90 kDa) [9].

Lilley i inni [24] opisali aktywność TGaz w korzeniach i tkankach łodyg roślin dwuliściennych (groch, bób) oraz jednuliściennych (pszenica, jęczmień). U wszystkich tych gatunków aktywność tego enzymu była wyższa w korzeniach aniżeli w liściach. Zaobserwowano również związek pomiędzy aktywnością enzymu a wiekiem tkanki roślinnej. W korzeniach aktywność TGazy wzrastała w okresie wczesnego stadium rozwoju, natomiast w liściach, zarówno rozwijających się jak i dojrzałych, utrzymywała się na tym samym poziomie. TGazy „pracujące” w korzeniu, jak i w liściu były enzymami zależnymi od jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , a stężenie wapnia wpływało na wydajność reakcji.

### 3.1. Udział TGaz w tworzeniu struktur komórkowych

#### 3.1.1. Cytoplazma

TGaza w cytoplazmie bierze udział w tworzeniu jej struktury. Przy wzroście aktywności TGazy zaobserwowano gwałtowną reorganizację cytoszkieletu u tworzącej się łagiewki pyłkowej [8]. Po inkubacji pyłku ze znakowaną PU na autoradiogramie pojawiły się dwa białka o masie 43 i 55 kDa. Białka te zidentyfikowano przy użyciu przeciwciał dla anty-aktyny i anty-tubuliny. Dodatkowo zaobserwować można było agregaty o wyższej masie cząsteczkowej.

#### 3.1.2. Ściana komórkowa

W ścianie komórkowej funkcję strukturalną, jaką może pełnić TGaza, można określić na podstawie doświadczeń wykonanych na glonach *Chlamydomonas reinhardtii* [32,36]. TGazy wpływają na prawidłową strukturę wchodzących w skład ściany glikoprotein. Podczas cyklu komórkowego glon wykształca dwie różniące się składem ściany. Ściana tzw. „wegetatywna”, w której tworzeniu bierze udział TGaza, otacza komórki zarówno wegetatywne, jak i generatywne i jest bogata w glikoproteiny rozpuszczalne w alkalicznym środowisku. *Chlamydomonas reinhardtii* wydziela poza protoplast TGazę o masie 72 kDa. Wzbogacenie ściany w glikoproteiny poprzedza wysoka aktywność enzymu. Zaobserwowano trójstopniowy proces: wzrost aktywności TGazy, poprzedzający syntezę glikoprotein i formowanie się „delikatnej struktury”, która organizuje się stopniowo w samotworzącą się „konstrukcję” ściany oraz oksydacyjną reakcję, w której wyniku tworzona jest finalna struktura ściany typu „wegetatywnego” [36]. Podawanie kadaweryny, SM, SD i PU w wysokim stężeniu do roztworu wpływało na zaburzenia w strukturze ściany. W ścianie komórkowej PA wiążą się do niezidentyfikowanych i zidentyfikowanych jako rozpuszczalne w środowisku alkalicznym glikoproteiny GP2 i GP3.



### 3.1.3. Chloroplasty

Obecność transglutaminaz stwierdzono w chloroplastach kapusty pekińskiej (*Brassica pekinensis*), w tylakoidach topinamburu (*Helianthus tuberosus*), szpinaku czy w chloroplastach glonu *Dunaliella salina* [30].

Przy zastosowaniu metod immunodetekcji w chloroplastach kalusa kukurydzy, topinamburu, rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), ziemniaka (*Solanum tuberosum*) i pomidora (*Lycopersicon esculentum*) wykryto transglutaminazy o masie cząsteczkowej ok. 58 kDa [1,30,].

Wzrost poziomu transglutaminaz w trakcie różnicowania się chloroplastów oraz ich lokalizacja w tylakoidach gran (białka antenowe LHCI) sugerują, że TGazy mogą współuczestniczyć w procesie formowania się gran przez wiązanie PA do białek antenowych [12,37].

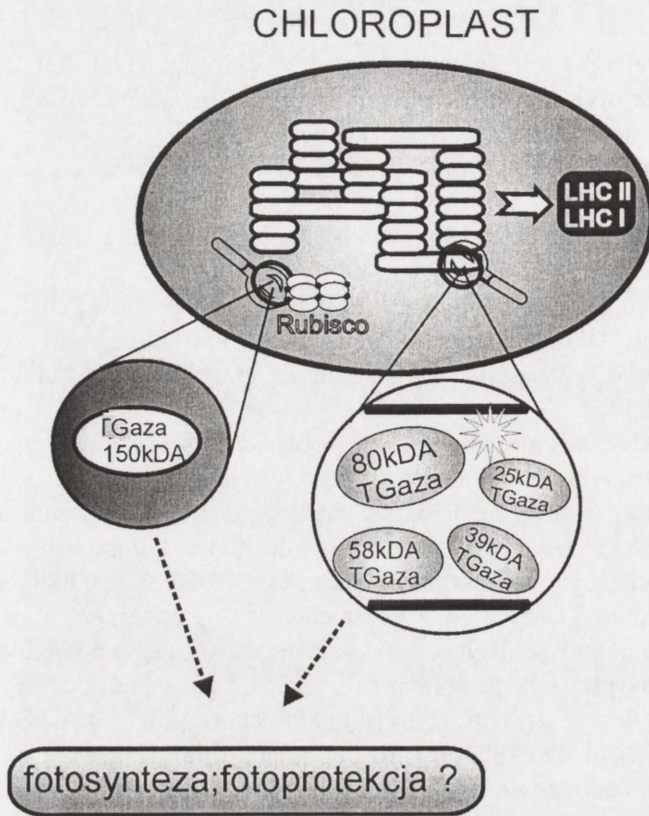
Zidentyfikowano niektóre substraty chloroplastowych transglutaminaz. W izolowanych chloroplastach *Helianthus tuberosus* znakowanych [<sup>14</sup>C]PU i [<sup>14</sup>C]SD w warunkach aktywności TGazy wiązały się do białek antenowych kompleksu chlorofil a/b-białko zbierającego energię świetlną (LHCII) oraz do białek kompleksów chlorofilowo-białkowych przekazujących energię wzbudzenia: CP24, CP26, CP29 [6,9].

Innym substratem TGazy w chloroplastach *Medicago sativa* i *Helianthus tuberosus* była większa podjednostka Rubisco. Wydaje się, że asocjacja podjednostek Rubisco może odbywać się przy udziale poliamin [6, 15,26]. Egzogenne dodanie poliamin (SD, SM) lub inhibitorów syntezy putrescyny (difluorometyloargininy) do poddanych stresowi osmotycznemu liści owsa hamowało degradację białek i utratę chlorofilu oraz stabilizowało białka tylakoidów D1, D2, cyt f i dużą podjednostkę Rubisco [2].

W chloroplastach *Helianthus tuberosus* przy zastosowaniu metod immunodetekcji zidentyfikowano chloroplastowe TGazy o masach 24 kDa, 58 kDa i 150 kDa [6,9,15]. Analiza PA-glutamyl pochodnych wykazała, że wiązanie PA do białek plastydowych przez TGazy ma miejsce w obydwóch kompartmentach chloroplastu – we frakcji tylakoidowej przez TGazy o masach 24 kDa i 58 kDa, a w stromie przez TGazę o masie 150 kDa [15]. Ponadto synergizm pomiędzy aktywnością enzymu w stromie i tylakoidach obserwowany w czasie doświadczenia był wyraźnie zależny od światła.

TGaza, której charakterystyka jest zbliżona do tej zidentyfikowanej u *Helianthus tuberosus* [15], została zlokalizowana w chloroplastach *Zea mays* L. [1,12]. Chloroplastowa TGaza kukurydzy preferowała wiązanie się SD do białek plastydowych i tworzenie się bis-pochodnych glutamylu [12]. Światło stymulowało aktywność enzymu. Izolacja kompleksu PSII (LHCII) i inkubacja wyizolowanej frakcji ze znakowanymi PU, SD i SM potwierdziły udział SD w potranslacyjnej modyfikacji białek kompleksu. Frakcja LHCI częściowo oczyszczona w gradiencie sacharozy, dodatkowo charakteryzowała się, poza białkami o masie 24 kDa i 58 kDa, białkiem o masie 39 kDa, rozpoznawanym przez przeciwciała anti-TG. Dwie metody oznaczania aktywności TGazy – kolorymetryczna i przy użyciu radioaktywnych poliamin – potwierdziły, że tylakoidowy enzym jest Ca<sup>2+</sup>-zależny [12].

Na rycinie 3 przedstawiono udział różnych transglutaminaz w poszczególnych subfrakcjach chloroplastów, gdzie katalityczna funkcja TGazy jest ściśle zależna od



RYCINA 3. Schemat udziału transglutaminaz (TGaz), w poszczególnych kompartmentach chloroplastów. Substratem TGazy stromy, formy enzymu niewymagającej dla swojej aktywności światła jest głównie Rubisco. Substratem dla zależnych od światła TGaz tylakoidowych są m.in. kompleksy chlorofil a/b-białko stanowiące główną antenę fotosystemu I i II (LHCI i LHCII). Włączanie poliamin w struktury białkowe chloroplastów przy udziale TGaz ma pozytywny wpływ na proces fotosyntezy i fotoochronę, co warunkuje prawidłowy wzrost i rozwój komórki (na podstawie [10], zmodyfikowane)

wapnia i prawdopodobnie wpływa na proces fotosyntezy i/lub fotoochronę, co ma pozytywny wpływ na wzrost i rozwój rośliny [10].

#### 4. TGAZY W PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI (PCD)

Badania nad procesem starzenia są istotne z uwagi na ich podstawowy i aplikacyjny charakter. Świeżo zerwane liście sałaty, które spożywamy czy świeżo ścięte kwiaty mają bardzo krótki okres przechowywania. Dlatego badania nad zabezpieczeniem komórki przed przyspieszonym starzeniem się głównym przedmiotem badań aplikacyjnych [39]. Chloroplasty są pierwszymi organellami, które ulegają degradacji w postępującym procesie starzenia. Bardzo szybko stają się nieaktywne, a białka fotosytemów poddane są proteolizie. Degradacji ulega też związany z nimi chlorofil [2].



W starzejących się płatkach kwiatów, obok takich zjawisk, jak rozpad jądra komórkowego, fragmentacja DNA, modyfikacje w strukturze ściany komórkowej, spadek stężenia białka w komórce, obniżenie się zawartości wody i pigmentów, zmniejszenie integralności błon, zaobserwowano wzrost w aktywności TGazy, postrzegany jako wzrost poziomu pochodnych glutamyl-PA oraz wzrost ilości modyfikowanych białek [31]. Być może w PCD zaangażowana jest jedna z form TGazy o masie 58 kDa, którą zlokalizowano przy pomocy metod immunologicznych. Zaobserwowano, że w procesie starzenia płatków kwiatów, po egzogennym podaniu SM, mimo że nastąpiła fragmentacja DNA i uszkodzenia wakuoli, żywotność chloroplastów została zauważalnie przedłużona. Zahamowanie procesu degradacji chloroplastów może być związane z kowalentnym wiązaniem się SM do substratów TGaz zlokalizowanych w różnych kompartmentach komórki, nie tylko w chloroplastach [31].

PA znane są jako czynnik anty-starzeniowy w liściach: opóźniają ten proces poprzez tymczasowe zabezpieczenie błon przed rozpadem, opóźniają degradację kwasów nukleinowych i białek wchodzących w skład fotosystemów [2,23,27].

Votyakova i inni [38] badali włączanie się PA do białek roślinnych mitochondriów. Organelle izolowano z ziemniaków (*Solanum tuberosus* L.) i fasoli (*Phaseolus aureus* Roxb.). Aktywność TGaz wykazano poprzez oznaczenie przy użyciu radioaktywnych poliamin ich glutamylowych pochodnych. Aktywność enzymu była zależna od temperatury (brak włączania przy 0°C). Aktywność TGazy we frakcji matriks mitochondrialnej nie wzrastała proporcjonalnie do czasu, podczas gdy we frakcji błon obserwowano znaczny wzrost radioaktywności w czasie inkubacji. Zatrzymanie reakcji na różnych etapach włączania się radioaktywnych PA pokazało, że spójność struktury błon jest nierozzerwalnie związana z włączaniem się PA w te struktury podczas translacji bądź w wyniku modyfikacji potranslacyjnej. Jedno z białek, które uległo modyfikacji, zidentyfikowano jako białko błonowe charakteryzujące się sekwencją zbliżoną do katalazy (katalaza jest rozpuszczalnym białkiem matriks mitochondrialnego). To spostrzeżenie pozwoliło autorom na wysunięcie hipotezy, że poliaminy wiązane do białek prawdopodobnie poprzez TGazy mogą mieć swój udział w oksydacyjnym metabolizmie w czasie apoptozy.

## 5. ASPEKT BIOTECHNOLOGICZNY

Wykorzystanie TGaz z uwagi na ich udział w tworzeniu „sieci” połączeń białkowych i powstawanie tzw. supramolekuł może mieć znaczenie aplikacyjne. Powszechnie stosuje się TGazy w przemyśle spożywczym. Dodawane są do mięs, ryb, chleba i przetworów mlecznych w celu ulepszenia ich jakości poprzez uzyskanie odpowiedniej konsystencji produktu [16].

To szerokie zastosowanie TGaz wpłynęło na opracowanie niedrogiego, wydajnego i bezpiecznego źródła do produkcji rekombinowanych białek. Bakteria *Streptococcus mobaraensis* [4,17,18,22] jest obecnie głównym systemem ekspresji, produkującym rekombinowane białko TGazy. Aczkolwiek białka produkowane w kulturach bakteryjnych nie są poddawane glikozylacji (brak glikozylacji, może prowadzić enzym do utraty stabilności bądź utraty funkcji biologicznej). Z dużo mniejszą wydajnością niż u eukariotów tworzone też są mostki dwusiarczkowe, co może wpływać na wadliwe

fałdowanie się białka bądź strącanie w formie ciał inkluzyjnych. Niektóre z tych problemów, głównie związane z modyfikacją potranslacyjną białek, mogą być rozwiązane poprzez użycie drożdżowego systemu ekspresji [40]. Jednak mechanizm glikozylacji u drożdży i u eukariotów jest różny.

Większość ludzkich białek produkuje się w liniach komórkowych ssaków. Ma to duże znaczenie dla zachowania prawidłowego przebiegu posttranslacyjnych modyfikacji. Jednak koszty, jakie wiążą się z założeniem i utrzymaniem takich sterylnych linii, są czynnikiem ograniczającym [16,40].

Roślinny system ekspresji jest znacznie tańszy, bezpieczniejszy, wydajny i wygodny. Rośliny wyższe są atrakcyjnym gospodarzem do ekspresji białek wykorzystywanych w produkcji farmaceutyków, pasz dla zwierząt, w przemyśle spożywczym, przy diagnostyce medycznej i terapii. Rekombinowane białka mogą być deponowane w nasionach, przechowywane w ciałach białkowych endospermy, gdzie chronione są przed cytoplazmatyczną proteolizą i późniejszą programowaną śmiercią komórki. Nasionie jest stabilne przez miesiące, a nawet lata. Zastosowanie systemu roślinnego pozwala również na redukcję kosztów dystrybucji i przechowywania. W przypadku białek, które są wykorzystywane w przemyśle, materiał roślinny może być bezpośrednio dodany na jednym z etapów produkcji, co dodatkowo eliminuje koszty ekstrakcji i oczyszczania [40].

Claparos i inni [3] zaproponowali system produkcji TGazy pozyskanej z prostaty szczura w roślinnym systemie ekspresji. W dojrzały zarodek ryżu wstrzyknięto konstrukt zawierający gen szczurzej TGazy działający pod konstytutywnym promotorem genu ubikwityny. Wprowadzony gen ulegał transkrypcji i translacji. Aktywność TGaz w materiale potwierdzono przy użyciu metody kolorymetrycznej *in vitro*. Enzym produkowany jest w nieaktywnej formie, co zabezpiecza komórki przed niekontrolowanym i bezcelowym tworzeniem się koniugatów białkowych. TGaza naturalnie występująca w gruczole ma formę nieaktywną, która zostaje uaktywniona w momencie wydzielania dokrewnego. Ryż mógłby zatem stać się alternatywnym systemem ekspresji rekombinowanej TGazy dla bakteryjnego *Streptovorticillum mobaraensis*.

## 6. WNIOSKI

Badania nad roślinnymi TGazami opóźniają trudności związane z oczyszczeniem i z sekwencjonowaniem tych enzymów. Trudność stanowi także znalezienie sekwencji homologicznej pomiędzy TGazami pochodzenia zwierzęcego a jakąkolwiek sekwencją peptydów dostępną w roślinnej bazie danych, nawet jeśli baza ta zawiera w przypadku niektórych gatunków w pełni zsekwencjonowany genom. Kilka doniesień potwierdza jednak obecność i aktywność TGaz w komórce roślinnej:

- ◆ zidentyfikowano w ekstraktach roślinnych typowe produkty katalizy, pochodne glutamylowe poliamin,
- ◆ potwierdzono, że koniugacja grup aminowych wymaga jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- ◆ rozdzielone na żelu SDS-PAGE roślinne preparaty białkowe immunolokalizowano z pozytywnym efektem przy użyciu specyficznych przeciwciał anti-TGaz pochodzenia zwierzęcego,



- ◆ enzym roślinny prawdopodobnie zawierał cysteinę w swym centrum aktywnym, a jego aktywność zależna była od DTT,
- ◆ rekombinowane białko zawierające Cys-His-Asp obecne w domenie katalitycznej TGazy, pochodzące z *Arabidopsis thaliana* L., wykazywało typową aktywność TGazy.

## LITERATURA

- [1] BERNET E, CLAPAROS I, DONDINI L, SANTOS M, SERAFINI-FRACASSINI D, TORNE JM. Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases, and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize callus and their chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 1–11.
- [2] BESFORD RD, RICHARDSON CM, CAMPOS JL, TIBURCIO AF. Effect of polyamines on stabilization complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 1993; **189**: 201–206.
- [3] CLAPAROS M I, BASSIE L, MIRO B, DEL DUCA S, RODRIGUEZ-MONTESINOS J, CHRISTOU P, SERAFINI-FRACASSINI D, CAPELL T. Transgenic rice as a vehicle for the production of the industrial enzyme transglutaminase. *Transgenic Res* 2004; **13**: 195–199.
- [4] CORTEZ JM, BONNER P, GRIFFIN M. A method for enzymatic treatment of textiles such as wool. World Patent 2002; W00204739.
- [5] DEL DUCA S, FAVALI A, SERAFINI-FRACASSINI D, PEDRAZZINI R. Transglutaminase-like activity during greening and growth of *Helianthus tuberosus* explants. *Protoplasma* 1993; **174**: 1–9.
- [6] DEL DUCA S, TIDU V, BASSI R, ESPOSITO C, SERAFINI-FRACASSINI D. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 1994; **193**: 283–289.
- [7] DEL DUCA S, BENINATI S, SERAFINI-FRACASSINI D. Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl- and acetyl-derivatives. *Biochem J* 1995; **305**: 233–237.
- [8] DEL DUCA S, BREGOLI AM, BERGAMINI C, SERAFINI-FRACASSINI D. Transglutaminase-catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during the germination of *Malus domestica* pollen. *Sex Plant Reprod* 1997; **10**: 89–95.
- [9] DEL DUCA S, DONDINI L, DELLA MEA M, MUNOZ DE RUEDA P, SERAFINI-FRACASSINI D. Factors affecting transglutaminase activity catalysing polyamine conjugation to endogenous substrates in entire chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**(6): 429–439.
- [10] DEL DUCA S, SERAFINI-FRACASSINI D. Transglutaminases of Plant. [W] Metha K, [ed.]. Transglutaminases. Family of enzyme with diverse functions. Cleveland Ohio, USA, Eckert (in press).
- [11] DELLA MEA M, CAPARROS-RUIZ D, CLAPAROS I, SERAFINI-FRACASSINI D, RIGAU J. AtPnglp: The First Plant Transglutaminase. *Plant Physiol* 2004; **135**: 1–9.
- [12] DELLA MEA M, DI SANDRO A, DONDINI L, DEL DUCA S, VANTINI F, BERGAMINI C, BASSI R, SERAFINI-FRACASSINI D. A *Zea mays* 39 kDa thylakoid transglutaminase catalyses Light Harvesting Complex II by polyamines in a light-dependent way. *Planta* 2004; DOI: 10.1007/s00425-004-1278-6.
- [13] DONDINI L, BONAZZI S, SERAFINI-FRACASSINI D. Recovery of growth capacity and of chloroplast transglutaminase activity induced by polyamines in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina*. *J Plant Physiol* 2000; **157**: 473–480.
- [14] DONDINI L, BONAZZI S, DEL DUCA S, BREGOLI AM, SERAFINI-FRACASSINI D. Acclimation of chloroplast transglutaminase to high NaCl concentration in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina* and in its wild type. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 185–197.
- [15] DONDINI L, DEL DUCA S, DALL'AGATA L, BASSI R, GASTALDELLI, DELLA MEA M., DI SANDRO A, CLAPAROS I, SERAFINI-FRACASSINI D. Suborganellar localisation and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta* 2003; **217**: 84–95.
- [16] GRIFFIN M, CASADIO R, BERGAMINI CM. Transglutaminase: nature's biological glues. *Biochem J* 2002; **368**: 377–396.
- [17] IRANZO M, AGUADO C, PALLOTTI C, CANIZARES JV, MORMENEO S. Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. *Microbiology* 2002; **148**: 1329–1334.
- [18] ISHII C, SOEDA T, YAMAKAZI K. Method for the production of yoghurt. Eur Patent 1994; EP0610649.
- [19] KANG H, CHO YD. Purification and properties of transaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **223**: 288–292.

- [20] KANG H, LEE SG, CHO YD. Identification of glycinin *in vivo* as a polyamine-conjugated protein via a  $\gamma$ -glutamyl linkage. *Biochem J* 1998; **332**: 467–73.
- [21] KLEIN JD, GUZMAN E, KUEHN GD. Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *J Bacteriol* 1992; **174**: 2599–2605.
- [22] KURALSHI C, SAKAMOTO J, YAMAZAKI M, SUSU Y, KUHARA C, SOEDA T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J Food Sci* 1997; **62**: 488–497.
- [23] LEGOCKA J, SOBIESZCZUK-NOWICKA E. Poliaininy w chloroplastach. *Post Biol Kom* 2004; **31(1)**: 143–153.
- [24] LILLEY G, SKILL J, GRIFFIN M, BONNER PL. Detection of Ca<sup>2+</sup>-dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledoneous and dicotyledoneous plants. *Plant Physiol* 1998; **17**: 1115–1123.
- [25] LORAND L, GRAHAM RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Celi Biol* 2003; **4**: 140–156.
- [26] MARGOSIAK SA, DHARMA A, BRUCE-CAVER MR, GONZALES AP, LOUIE D, KOEHN GD. Identification of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Physiol* 1990; **92**: 88–96.
- [27] NIKLAS A, BUTOWIT R, JAŻDŻEWSKA E, MAJEWSKA-SAWKA A. Poliaininy w komórce roślinnej: synteza, mechanizm działania i funkcja. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 33–49.
- [28] RUIZ-HERRERA J, IRANZOM, ELORZA MV, SENTANDREUR R, MORMENEOS. Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Arch Microbiol* 1995; **164**: 186–193.
- [29] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, D'ORAZI D. First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymic activity in plant. *Plant Physiol* 1988; **87**: 757–761.
- [30] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, BENINATI S. Plant Transglutaminases. *Phytochem* 1995; **40(2)**: 355–365.
- [31] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, MONTI F, POLI F, SACCHETTI G, BREGOLI AM, BIONDI S, DELIA MEA. Transglutaminase activity during senescence and programmed cell death in the corolla of tobacco (*Nicotiana tabacum*) flowers. *Cell Death Differ* 2001; **9**: 309–321.
- [32] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. Biochemistry and function of plant transglutaminases. *Mineerva Biotech* 2002; **14**: 135–141.
- [33] SIGNORINI M, BENINATI S, BERGAMINI C. Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *J Plant Physiol* 1991; **137**: 547–552.
- [34] SIŃSKA I. Poliaininy i aminy aromatyczne. [w] Jankiewicz LS. [red.]. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN 1997; 150–166.
- [35] SUZUKI T, PARK H, ANDERSON TILL E, LENNARZ WJ. The PUB domain: a putative protein-protein interaction domain implicated in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **287**: 1083–1087.
- [36] WAFFENSCHMIDT S, KUSCH T, WOESSNER JP. A transglutaminase immunologically related to tissue transglutaminase catalyzes cross-linking of cell wall proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1999; **121**: 1003–1015.
- [37] VILLALOBOS JM, TORNE J, RIGAU I, OLLES I, CLAPAROS M, SANTOS V. Immunogold localization of transglutaminase related to grana development in different maize cell types. *Protoplasma* 2001; **216**: 155–163.
- [38] VOTYAKOVA VT, WALLACE HM, DUNBAR B, WILSON SB. The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria. *Eur J Biochem* 1999; **260**: 250–257.
- [39] ZABEL M. Uszkodzenie i śmierć komórki. [w] Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M, Warchol J. [red.]. Podstawy Cytofizjologii. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN 1997; 374–391.
- [40] ZENKTELER E, BACH A, SKUCIŃSKA B. Zastosowanie praktyczne biotechnologii. [w] Malepszy S. [red.]. Biotechnologia roślin. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN 2001; 261–306.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano 07.04.2005 r.

Przyjęto: 23.05.2005 r.

Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań

e-mail: legocka@amu.edu.pl



## WPLYW OPIOIDÓW NA STEROIDOGENEZĘ W KOMÓRKACH ZIARNISTYCH I OSŁONKI WEWNĘTRZNEJ PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH ŚWIŃ; MECHANIZM DZIAŁANIA AGONISTY OPIOIDOWEGO FK 33-824\*

THE INFLUENCE OF OPIOIDS ON STEROIDOGENESIS  
IN GRANULOSA AND THECA INTERNA CELLS FROM PORCINE  
OVARIAN FOLLICLES; THE MECHANISM OF ACTION  
OF OPIOID AGONIST FK 33-824

Tadeusz KAMIŃSKI

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
w Olsztynie

*Streszczenie:* Peptydy opioidowe należą do grupy czynników, wytwarzanych w pęcherzyku jajnikowym świń, wpływających na funkcjonowanie, występujących w nim, komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej. W trakcie krótkiej inkubacji tych komórek z opioidami (agonistami receptorów  $\mu$ ,  $\delta$  lub  $\kappa$ ) przeważa hamowanie steroidogenezy, zaś w obecności LH, czynnika tropowego dla komórek izolowanych z dużych pęcherzyków, dominuje pobudzanie wytwarzania hormonów steroidowych pod wpływem opioidów. Mechanizm hamującego działania opioidów na steroidogenezę pęcherzykową badano wykorzystując agonistę głównie receptorów  $\mu$ , FK 33-824. Pod wpływem FK 33-824 stwierdzono zahamowanie aktywności cyklazy adenylanowej, kinaz białkowych A oraz C w komórkach ziarnistych, a także fosfatydyloinozytoloswoistej fosfolipazy C, cyklazy adenylanowej, kinaz białkowych A i C w komórkach osłonki wewnętrznej świń.

*Słowa kluczowe:* świnia, opioidy, komórki ziarniste, komórki osłonki wewnętrznej, steroidogeneza, fosfatydyloinozytoloswoista fosfolipaza C, cyklaza adenylanowa, kinaza białkowa A, kinaza białkowa C.

*Summary:* Opioid peptides belong to a group of agents, produced in porcine ovarian follicles, which affect functions of granulosa and theca interna cells. During short incubation of the cells with opioids ( $\mu$ ,  $\delta$  or  $\kappa$  agonists) inhibition of steroidogenesis prevails, while in the presence of LH, trophic agent for these cells

\*Praca finansowana z grantu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, projekt nr 020600.0206.

(from large follicles), stimulation of steroid hormones under influence of opioids predominates. The mechanism of inhibitory action of opioids on follicular steroidogenesis was investigated using the agonist of mainly  $\mu$  receptors, FK 33-824. Under influence of FK 33-824 it was found attenuation of adenylyl cyclase, protein kinases A and C activities in granulosa cells as well as phosphoinositide-specific phospholipase C, adenylyl cyclase, protein kinases A and C activities in theca interna cells.

*Key words:* pig, opioids, granulosa cells, theca interna cells, steroidogenesis, phosphoinositide-specific phospholipase C, adenylyl cyclase, protein kinase A, protein kinase C.

Opioidy są grupą związków, zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznych, o działaniu zbliżonym do alkaloidów fenantrenowych, głównie morfiny, otrzymanych z maku lekarskiego (*Papaver somniferum*). Endogenne opioidy tworzą trzy główne grupy peptydów pochodzących od trzech prekursorów: proopiomelanokortyny (POMC), proenkefaliny i prodynorfiny. Z POMC powstają peptydy opioidowe  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -endorfina, a także peptydy nieopiodowe: ACTH,  $\alpha$ - i  $\beta$ -MSH, CLIP,  $\beta$ -LPH. Proenkefalina jest prekursorem m.in. Met- i Leu-enkefaliny, zaś prodynorfina – m.in. dynorfin, rimorfiny oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -neoendorfiny. Cechą wspólną wszystkich peptydów opioidowych jest znajdująca się na N-końcu każdego peptydu sekwencja 5 aminokwasów: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met lub Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, która decyduje o ich aktywności biologicznej. Najlepiej poznanym miejscem syntezy, a także głównym źródłem opioidów w organizmie są różne struktury ośrodkowego układu nerwowego. Opioidy działają poprzez specyficzne dla siebie receptory, spośród których zazwyczaj wyróżnia się trzy podstawowe klasy  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  oraz podklasy  $\mu_1$  i  $\mu_2$ ,  $\delta_1$  i  $\delta_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  i  $\kappa_3$ . Z wyjątkiem najslabiej poznanych endomorfina działających wyłącznie poprzez receptory  $\mu$ , inne opioidy nie wykazują wysokiej selektywności w stosunku do jednego typu receptora, a mają jedynie określone preferencje: endorfiny – do receptorów  $\mu$ , enkefaliny – receptorów  $\delta$ , dynorfiny zaś – do receptorów  $\kappa$ . Endogenne opioidy są dobrze znane jako neuromediatory i neuromodulatory kontrolujące czucie bólu, przyjmowanie pokarmu, temperaturę ciała, krążenie i oddychanie. Sugeruje się, że peptydy opioidowe mogą pełnić funkcje humoralnych przekaźników między ośrodkowym układem nerwowym a układem immunologicznym. Opioidy uczestniczą także w reakcjach stresowych oraz w procesach uczenia się i pamiętania [18].

## UDZIAŁ OPIOIDÓW W REGULACJI STEROIDOGENEZY W PĘCHERZYKACH JAJNIKOWYCH ŚWIŃ

Endogenne peptydy opioidowe mają znaczny udział w regulacji wydzielania podwzgórzowych czynników uwalniających (m.in. somatoliberyny, TRH, GnRH) oraz hormonów przysadkowych, takich jak: GH, prolaktyna, LH, FSH. Dostyć dobrze poznany jest ich wpływ na funkcjonowanie neurosekrecyjnego systemu GnRH/LH u samic różnych gatunków [5, 57, 58]. Opioidy regulując wydzielanie gonadotropin wpływają tym samym, w sposób pośredni, na funkcje układu rozrodczego. Można sądzić, że istnieje również droga bezpośrednia umożliwiająca endogennym opioidom kontrolę tego układu. U podstaw tego przypuszczenia leży fakt obecności peptydów



opiodowych oraz właściwych dla nich informacyjnych kwasów nukleinowych w narządach układu rozrodczego, w tym także w komórkach jajnika.  $\beta$ -Endorfinę zlokalizowano w ciałkach żółtych i płynie pęcherzykowym świń [34, 63], w ciałkach żółtych, komórkach ziarnistych i śródmiaższowych gryzoni [48, 49, 50], w ciałku żółtym krów [20], w płynie pęcherzykowym owiec [45] i kobiet [61] oraz w komórkach osłonki wewnętrznej kobiet [2]. Stwierdzono, że zawartość  $\beta$ -endorfiny w ciałkach żółtych świni wielokrotnie wzrasta w miarę ich rozwoju, osiągając najwyższą wartość między 14–18 dniem cyklu rujowego [63], przy czym za syntezę  $\beta$ -endorfiny są odpowiedzialne głównie duże komórki lutealne, które wydzielają ok. 15 razy więcej tego peptydu w stosunku do komórek małych [64]. Z kolei w płynie pęcherzykowym świń najwyższe stężenie  $\beta$ -endorfiny odnotowano w materiale izolowanym z małych pęcherzyków z pierwszych dni cyklu rujowego [34].

Obecność Met-enkefalinę wykazano w jajnikach gryzoni [13, 43], w ciałkach żółtych kobiet i krów [13] oraz w płynie pęcherzykowym kobiet [61]. Peptydy z grupy dynorfin zidentyfikowano w płynie pęcherzykowym świń [72], w ciałku żółtym krów [20] oraz w komórkach ziarnistych, lutealnych i śródmiaższowych szczurów [49]. Wiele danych wskazuje, że peptydy opiodowe są wytwarzane w gonadach. W jajnikach gryzoni wykazano obecność mRNA dla proopiomelanokortyny [27, 52, 69], proenkefalinę [27] oraz prodynorfinę [17]. Ostatnio, ekspresję genów prekursorów opiodowych stwierdzono też w komórkach lutealnych i komórkach pęcherzyków jajnikowych świń [75, 76]. Dodatkowym źródłem opiodów w jajnikach mogą być zakończenia  $\beta$ -endorfinoergicznych włókien nerwowych, które zlokalizowano w osłonce wewnętrznej i zewnętrznej pęcherzyków jajnikowych świń [26].

Jajnikowa sekrecja opiodów jest prawdopodobnie kontrolowana przez gonadotropiny. W badaniach własnych zaobserwowano, że FSH w sposób zależny od dawki stymuluje uwalnianie  $\beta$ -endorfiny przez komórki ziarniste pochodzące z dużych pęcherzyków jajnikowych świń. Największy, ośmiokrotny, wzrost zanotowano po podaniu do medium FSH w dawce 100 ng/ml. Pobudzające działanie FSH było istotnie ograniczone przez progesteron w dawce  $10^{-5}$  M [34]. Podobne badania, przeprowadzone na komórkach lutealnych świń, pozwoliły zaobserwować stymulujący wpływ hCG na uwalnianie  $\beta$ -endorfiny przez małe i duże komórki lutealne [64]. Kato i wsp. [40] zanotowali zbliżony wpływ hCG na uwalnianie  $\beta$ -endorfiny z komórek lutealnych szczurów. W regulacji uwalniania  $\beta$ -endorfiny przez komórki lutealne świń uczestniczą ponadto: oksytocyna, prolaktyna, progesteron [63] i  $\text{TNF}\alpha$  [64]. Spośród aktywnych endokrynnie komórek jajnika świń, najbardziej autonomiczne, w odniesieniu do sekrecji  $\beta$ -endorfiny, okazały się komórki osłonki wewnętrznej – żaden z badanych hormonów (LH, PRL, steroidy jajnikowe) nie miał statystycznie istotnego wpływu na sekrecję tego opiodu. Obserwowano jedynie tendencje do podwyższania, wskutek działania LH ( $p=0,094$ ), lub hamowania, w przypadku PRL ( $p=0,056$ ), sekrecji  $\beta$ -endorfiny przez komórki osłonki wewnętrznej [30].

Stwierdzenie lokalnej syntezy opiodów oraz wykazanie obecności w jajnikach świń receptorów opiodowych [25, 72] wskazuje na możliwość auto- bądź parakrynnego wpływu peptydów opiodowych na jajnik, w tym także na steroidogenezę jajnikową. Tego rodzaju wpływ zaobserwowano wcześniej w przypadku komórek ziarnistych kobiet [21] oraz komórek lutealnych krów [67, 80] i szczurów [40]. Został on także odnotowany

w odniesieniu do komórek ziarnistych [24, 34, 36], osłonki wewnętrznej [30] i lutealnych [35] świń. Badania te dają jednak jedynie fragmentaryczny obraz wpływu opioidów na sekrecję steroidów, ponieważ używano w nich z reguły tylko jednego spośród ok. 30 opioidów obecnych w organizmie; najczęściej  $\beta$ -endorfinę lub syntetyczny związek działający w sposób zbliżony do niej (FK 33-824). Dokładniejszych danych dostarczyły kolejne badania z wykorzystaniem 9 opioidów, 3 agonistów receptorów  $\mu$  – [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Met(O<sup>5</sup>-ol]-enkefalinę (FK 33-824), [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-enkefalinę (DAMGO),  $\beta$ -endorfinę; 3 agonistów receptorów  $\delta$  – met-enkefalinę, leu-enkefalinę, [D-Pen<sup>2</sup>, Pen<sup>5</sup>]-enkefalinę (DPLPE) oraz 3 agonistów receptorów  $\kappa$  – dynorfinę A, dynorfinę B, U-50488. Inkubując komórki ziarniste świń wyizolowane z dużych pęcherzyków z agonistami receptorów opioidowych zanotowano obniżenie podstawowego (niestymulowanego innymi czynnikami) wydzielania androstendionu (A<sub>4</sub>), testosteronu (T) i estradiolu (E<sub>2</sub>) oraz nie stwierdzono ich wpływu na sekrecję progesteronu (P<sub>4</sub>). Obecność w pożywce LH – hormonu tropowego dla komórek ziarnistych w tym stadium rozwoju pęcherzyka jajnikowego – spowodowała zmianę hamującego wpływu opioidów na sekrecję androgenów na pobudzający. Stwierdzono ponadto, że komórki ziarniste poddane działaniu LH zmniejszyły wydzielanie E<sub>2</sub> pod wpływem agonistów receptorów  $\kappa$  [32]. Odnotowano również zbliżone działanie opioidów na steroidogenezę w komórkach osłonki wewnętrznej izolowanych z dużych pęcherzyków jajnikowych, tj. hamowanie podstawowego wydzielania hormonów steroidowych oraz wzmacnianie sekrecji tych steroidów przez komórki stymulowane LH. Obserwowano także różnice między komórkami obu typów w odpowiedzi na opioidy: steroidogeneza w komórkach osłonki wewnętrznej, w odróżnieniu od komórek ziarnistych, na wcześniejszym etapie (tj. wytwarzania P<sub>4</sub>) była podatna na działanie opioidów. Ponadto zarówno podstawowa sekrecja androgenów, jak i stymulowana sekrecja E<sub>2</sub> przez komórki osłonki nie były modulowane przez ligandy receptorów  $\kappa$  (tab. 1) [31].

Wpływ agonistów trzech podstawowych typów receptorów opioidowych na steroidogenezę w komórkach pęcherzykowych był generalnie podobny. Ta prawidłowość w mniejszym stopniu była zachowana w odniesieniu do ligandów receptorów  $\kappa$ . W przeciwieństwie do agonistów receptorów  $\mu$  i  $\delta$  nie zmieniały one podstawowej sekrecji androgenów i pobudzały stymulowaną LH sekrecję P<sub>4</sub> w komórkach osłonki wewnętrznej oraz hamowały wydzielanie E<sub>2</sub> przez komórki ziarniste inkubowane w obecności LH (tab. 1). Inny, szczególnie w porównaniu z receptorami  $\mu$ , efekt pobudzenia receptorów  $\kappa$  jest także widoczny w odniesieniu do funkcjonowania centralnego układu nerwowego, włączając w to kontrolę bólu, pamięć, tolerancję i uzależnienie [59, 77].

Każdy z dziewięciu wykorzystanych w doświadczeniu opioidów użyty został, czy to samodzielnie czy też w kombinacji z LH, w czterech koncentracjach: 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> i 10<sup>-6</sup> M. W wielu przypadkach, opioidy działały najbardziej efektywnie, kiedy zastosowano je w najniższych dawkach. Może to wynikać z dwufazowego działania opioidów, najlepiej poznanego w przypadku ich wpływu na produkcję cAMP, która jest pobudzana lub hamowana w zależności od dawki użytego związku [70]. Podobne (dwufazowe) działanie opioidów było też obserwowane w zakresie ich wpływu na sekrecję hormonów steroidowych. Stwierdzono mianowicie, że opioidy w niższych



TABELA 1. Wpływ agonistów receptorów opioidowych  $\mu$  (FK 33-824, DAMGO,  $\beta$ -endorfiny),  $\delta$  (met-enkefalin, leu-enkefalin, DPLPE) oraz  $\kappa$  (dynorfiny A, dynorfiny B, U-50488) na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej izolowanych z dużych pęcherzyków jajnikowych świń podczas 4-godzinnej inkubacji  $\uparrow$  – wzrost wydzielania hormonu pod wpływem agonistów opioidowych; brak – nie stwierdzono wpływu;  $\downarrow$  – zahamowanie wydzielania hormonu;  $P_4$  – progesteron;  $A_4$  – androstendion; T – testosteron;  $E_2$  – estradiol

Rodzaje komórek pęcherzyka jajnikowego	Zmiany w sekrecji hormonów steroidowych pod wpływem																	
	agonistów receptorów $\mu$						agonistów receptorów $\delta$						agonistów receptorów $\kappa$					
	$P_4$	$A_4$	T	$E_2$	$P_4$	$A_4$	T	$E_2$	$P_4$	$A_4$	T	$E_2$	$P_4$	$A_4$	T	$E_2$		
Komórki ziarniste inkubowane bez LH	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$		
Komórki ziarniste inkubowane w obecności LH	brak	brak	$\uparrow$	brak	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	brak	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	brak	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	$\downarrow$		
Komórki osłonki wewnętrznej inkubowane bez LH	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	brak	brak	$\downarrow$		
Komórki osłonki wewnętrznej inkubowane w obecności LH	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	brak	brak	$\uparrow$	brak	brak	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	brak		

<sup>1</sup>pod wpływem Leu-enkefaliny w dawce  $10^{-9}$  M i Met-enkefaliny w dawce  $10^{-6}$  M; <sup>2</sup>pod wpływem dynorfiny A w dawce  $10^{-8}$  M;

<sup>3</sup>pod wpływem DPLPE w dawce  $10^{-7}$  M

koncentracjach ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M) hamowały, podczas gdy w wyższych ( $10^{-5}$  i  $5 \times 10^{-5}$  M) zwiększały sekrecję kortykosteronu przez komórki kory nadnerczy szczurów [78]. Nie sposób wykluczyć, że po zastosowaniu większej liczby dawek poszczególnych opioidów tego rodzaju efekt byłby obserwowany także w komórkach pęcherzyka jajnikowego.

Odnotowana w doświadczeniu odmienna odpowiedź komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej na opioidy użyte samodzielnie bądź w połączeniu z LH wskazuje na istnienie interakcji pomiędzy tymi czynnikami. Wydaje się, że miejscem interakcji mogą być wewnątrzkomórkowe szlaki transmisji sygnału indukowanego przez LH oraz opioidy. Zaliczamy do nich przede wszystkim szlaki z udziałem cykazy adenylationowej (AC) oraz kinazy białkowej A (PKA), a także fosfatydyloinozytoloswoistej fosfolipazy C (PLC) i kinazy białkowej C (PKC), o których wiadomo, że pośredniczą zarówno w działaniu opioidów [41], jak i LH [14, 83] na komórki jajnika świń. Niewykluczony jest również wpływ opioidów na ekspresję genu dla receptora LH. Zostało to stwierdzone w komórkach lutealnych świń, gdzie agonista receptorów  $\mu$ , FK 33-824, stymulował ekspresję tego genu w małych komórkach lutealnych i hamował w dużych [29].

Należy podkreślić, że opisane powyżej wyniki uzyskano w wyniku krótkiej, czterogodzinnej inkubacji komórek pęcherzyka jajnikowego. Wydłużenie inkubacji komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej z FK 33-824 do 24 godzin pociąga za sobą zmianę wpływu opioidu na podstawową sekrecję androgenów z hamującego (podczas czterogodzinnej inkubacji) na stymulujący oraz zanik wpływu na wydzielanie  $E_2$  [30, 34]. Wydłużenie inkubacji przypuszczalnie wpływa również na interakcje opioidów z gonadotropinami, o czym świadczy zahamowanie pod wpływem FK 33-824 sekrecji  $P_4$  przez komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej poddane dobowej inkubacji, odpowiednio, z FSH [34] i LH [30]. Przyczyną tych zmian jest prawdopodobnie zróżnicowany, w zależności od czasu ekspozycji, wpływ opioidów na aktywność enzymów pośredniczących w przesyłaniu wewnątrzkomórkowego sygnału inicjowanego połączeniem opioidu z odpowiednim receptorem. Zagadnienie to zostanie dokładniej omówione w drugiej części artykułu.

Opisane powyżej działanie opioidów odnosi się, jak wcześniej zaznaczono, do komórek wyizolowanych z dużych pęcherzyków jajnikowych. Reaktywność komórek na opioidy zmienia się w zależności od fazy rozwoju pęcherzyka, ponieważ ilość receptorów opioidowych w komórkach pęcherzyka jajnikowego świń obniża się w miarę jego wzrostu [25, 72]. Sugestia ta znajduje potwierdzenie w pracy Gregoraszcuk i Słomczyńskiej [24], w której stwierdzono hamujący wpływ  $\beta$ -endorfiny na sekrecję  $P_4$  przez komórki ziarniste z małych i średnich, lecz nie z dużych pęcherzyków jajnikowych. Ponadto hamujący wpływ opioidu na sekrecję  $P_4$  i  $E_2$  przez komórki stymulowane LH był wyraźnie silniej zaznaczony w stosunku do komórek izolowanych z pęcherzyków małych w porównaniu z jego wpływem na komórki pobrane z pozostałych rodzajów pęcherzyków.

Głównym zadaniem pęcherzyka jajnikowego jest stworzenie optymalnych warunków dla rozwijającej się komórki jajowej. Można zatem wnosić, że opioidy zmieniając sekrecję steroidów jajnikowych będą uczestniczyć w selekcji pęcherzyków i kontroli procesu owulacji. Pobudzenie przez opioidy sekrecji androgenów przez komórki ziarniste i



osłonki wewnętrznej w obecności LH (tzn. w warunkach przypominających sytuację *in vivo*) oraz hamowanie wydzielania  $E_2$  przez komórki osłonki pod wpływem ligandów receptorów  $\kappa$  może sugerować ich udział w indukcji atrezji pęcherzyków, a przez to w ich selekcji. Ponadto możliwe jest ich współdziałanie w kontroli dojrzewania oocytów i owulacji pęcherzyków. Hamujący wpływ  $\beta$ -endorfiny na te procesy został zaobserwowany u szczurów [22, 56] i krów [16].

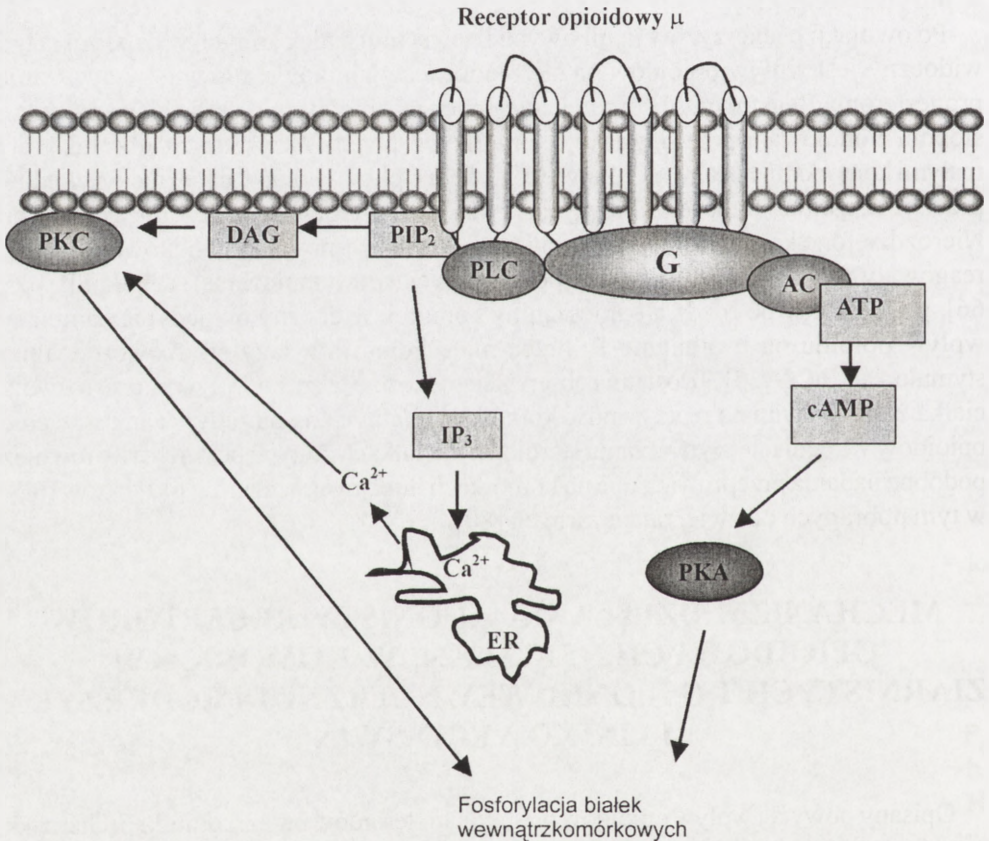
Mimo że oddziaływanie opioidów na sekrecję steroidów płciowych jest filogenetycznie „dobrze zakotwiczone”, o czym świadczy ich udział w regulacji wytwarzania tych hormonów w jajnikach płazów [86] i gadów [62], to różnice pomiędzy gatunkami dotyczące odpowiedzi komórek pęcherzyka jajnikowego na opioidy wydają się dość znaczne. Przykładowo, komórki ziarniste kobiet, u których wywołano superowulację, okazały się niewrażliwe na  $\beta$ -endorfinę, a reagowały wzrostem syntezy  $P_4$  jedynie pod wpływem Met-enkefalin. Warunkiem skutecznego działania enkefalin była obecność w pożywce FSH [21].

Po owulacji pęcherzyków jajnikowych i powstaniu ciałek żółtych w dalszym ciągu widoczny jest wpływ opioidów na steroidogenezę jajnikową, głównie wytwarzanie progesteronu. Reaktywność komórek lutealnych na opioidy wydaje się być w istotnym stopniu modulowana przez interakcje komórkowe, przede wszystkim między dużymi i małymi komórkami lutealnymi – inny jest bowiem wpływ opioidów na sekrecję steroidów przez mieszaninę komórek lutealnych, a inny na rozdzielone małe i duże komórki. Nierozdzielone komórki lutealne zarówno z fazy wczesno-, jak i środkowo-lutealnej reagowały na FK 33-824 wzrostem podstawowej (niestymulowanej) sekrecji  $P_4$  [65, 66], podczas gdy po rozdzieleniu mieszaniny komórek widoczny był jedynie hamujący wpływ opioidu na uwalnianie  $P_4$  przez małe komórki z fazy środkowo-lutealnej stymulowane hCG [35]. Ta ostatnia obserwacja wskazuje także na wpływ okresu rozwoju ciała żółtego świni na reaktywność komórek lutealnych na opioidy. Zaangażowanie opioidów w regulację wytwarzania steroidów w ciałkach żółtych potwierdziły również podobne badania przeprowadzone na komórkach lutealnych szczurów [40] i krów [67], w tym pobranych od zwierząt ciężarnych [80].

## MECHANIZM DZIAŁANIA AGONISTY RECEPTORÓW OPIOIDOWYCH, FK 33-824, W KOMÓRKACH ZIARNISTYCH I OSŁONKI WEWNĘTRZNEJ PĘCHERZYKA JAJNIKOWEGO ŚWIŃ

Opisany powyżej wpływ opioidów na sekrecję steroidów przez komórki pęcherzyka jajnikowego i inne struktury jajnika wydaje się być znacznie lepiej poznany w porównaniu z wewnątrzkomórkowymi procesami transmisji sygnału inicjowanymi przez opioidy i powodującymi zmianę aktywności steroidogenicznej komórek. Do niedawna mechanizm działania opioidów w jajniku był rozpatrywany na podstawie wyników badań przeprowadzonych głównie na komórkach układu nerwowego lub liniach komórkowych wywodzących się z tego układu, np. NG108-15 lub SH-SY5Y. Uzyskane dane dostar-

czyły dowodów pozwalających stwierdzić, że opioidy w komórkach układu nerwowego, działając poprzez receptory związane z białkami G, wpływają na aktywność przede wszystkim dwóch szlaków przesyłania sygnału: PLC/PKC i AC/PKA, a pośrednio także na kinazy aktywowane mitogenem oraz kanały jonowe dla potasu i wapnia [41]. Pierwszy ze szlaków zaczyna się od PLC, enzymu powodującego rozpad lipidu błonowego – fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu do dwóch tzw. wtórnych przekazników: inozytolo(1,4,5)trisfosforanu ( $IP_3$ ) i 1,2-diacylglicerolu (DAG).  $IP_3$ , po dyfuzji do siateczki śródplazmatycznej, powoduje uwolnienie z niej jonów  $Ca^{2+}$ , określanych czasem jako trzeci przekaznik, natomiast DAG pozostaje w błonie komórkowej aktywując specyficzne izoformy PKC (zależne od DAG). Spośród czterech znanych typów PLC ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) najbardziej zaangażowana w mechanizm działania opioidów wydaje się być  $PLC_{\beta}$ , aktywowana przez białka G związane m.in. z

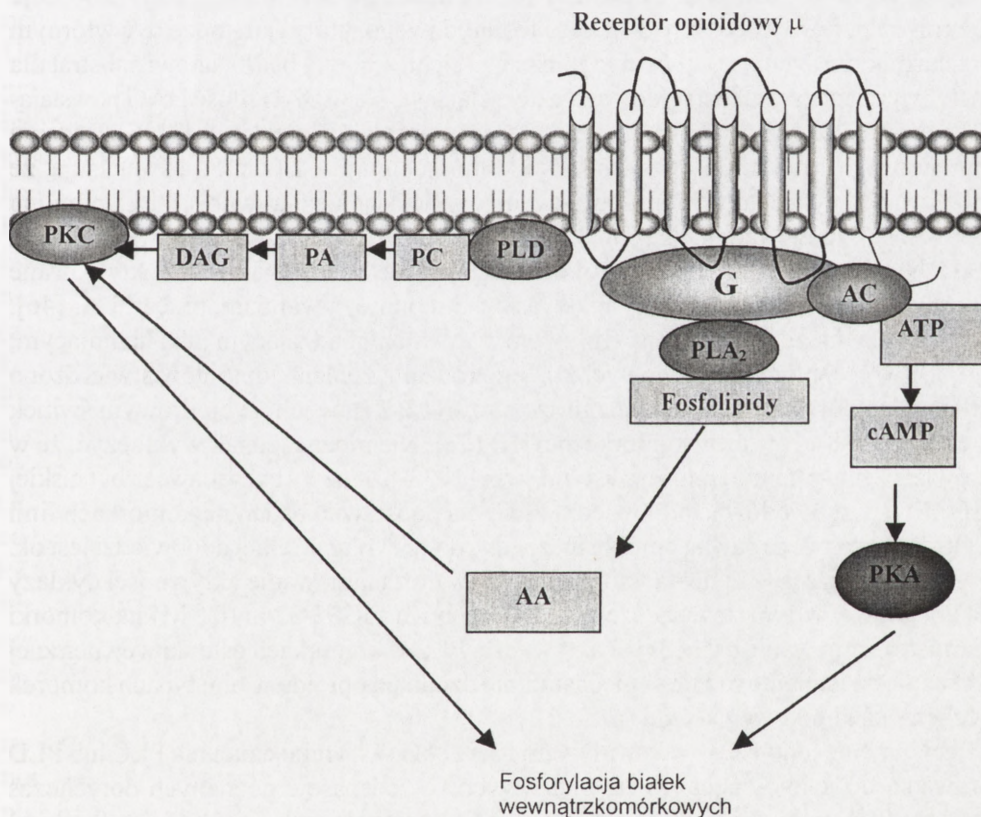


RYCINA 1. Wewnątrzkomórkowe szlaki transmisji sygnału przypuszczalnie wykorzystywane przez FK 33-824, agonistę głównie receptorów  $\mu$ , w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych świń (szczegóły w tekście). Objaśnienia: G – białka G; PLC – fosfatydyloinozytolo swoista fosfolipaza C; AC – cyklaza adenylnowa; PKA – kinaza białkowa A; PKC – kinaza białkowa C; DAG – 1,2-diacylglicerol;  $IP_3$  – inozytolo(1,4,5)trisfosforan;  $PIP_2$  – fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; ER – siateczka śródplazmatyczna



receptorami opioidowymi [41]. Izoformy  $PLC_{\beta}$  ( $\beta_{1-4}$ ) stwierdzono także w jajniku świń [44]. Obecność w komórce kilku izoform  $PLC_{\beta}$  zwiększa spektrum jej możliwych odpowiedzi na działanie opioidów, ponieważ w różny sposób wpływają na poszczególne rodzaje  $PLC_{\beta}$  [9].

Badając mechanizm działania opioidów w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej świń skupiono się na agonistach receptorów  $\mu$ , wykorzystując jeden z ligandów tych receptorów, FK 33-824 – syntetyczny peptyd naśladowujący działanie  $\beta$ -endorfiny, ale mniej od niej podatny na enzymatyczny rozkład [68]. Wykazane w komórkach osłonki wewnętrznej w odpowiedzi na FK 33-824 zmniejszone wytwarzanie  $IP_3$  [38], będącego wyznacznikiem aktywności PLC, sugeruje hamujący wpływ opioidu na aktywność tego enzymu. Osłabienie aktywności PLC obserwuje się czasem jako skutek zwrotnego (hamującego) działania pobudzonej PKC [41, 46]. W badaniach własnych,



RYCINA 2. Wewnątrzkomórkowe szlaki transmisji sygnału przypuszczalnie wykorzystywane przez FK 33-824, agonistę głównie receptorów  $\mu$ , w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych świń (szczegóły w tekście). Objaśnienia: G – białka G;  $PLA_2$  – fosfolipaza A<sub>2</sub>; PLD – fosfolipaza D; AC – cyklaza adenylnowa; PKA – kinaza białkowa A; PKC – kinaza białkowa C; DAG – 1,2-diacylglicerol; PC – fosfatydylocholina; PA – kwas fosfatydowy; AA – kwas arachidonowy

obniżeniu aktywności PLC towarzyszyło zahamowanie PKC, co wskazuje, że zmniejszenie aktywności PLC było efektem pierwotnym, wynikającym z bezpośredniego działania FK 33-824, a nie wtórnym, związanym z pobudzeniem PKC (rys. 1). W innych komórkach i tkankach obserwuje się tak pobudzenie [53, 73], jak i hamowanie [6, 28, 71] aktywności PLC pod wpływem opioidów. Z kolei w małych i dużych komórkach lutealnych świń stwierdzono zmian w sekrecji  $IP_3$  w wyniku działania FK 33-824 [35]. Należy zatem sądzić, że zaangażowanie PLC w przekaznictwo sygnału indukowanego przez opioid łączący się z odpowiednim receptorem (głównie  $\mu$ ) jest specyficzne dla poszczególnych komórek.

Komórki ziarniste świń należą do komórek, które nie odpowiedziały zmianą uwalniania  $IP_3$  na podanie opioidu [38], co – przy jednoczesnym zahamowaniu PKC – sugeruje istnienie innego niż PLC „łącznika” między kompleksem opioid-receptor-białka G a PKC. Kandydatami na tego „łącznika” mogą być fosfolipazy, D (PLD) i  $A_2$  ( $PLA_2$ ), o których wiadomo, że mogą pośredniczyć w działaniu opioidów (rys. 2). PLD powoduje hydrolizę fosfatydylocholino do kwasu fosfatydowego, który sam może być wtórnym przekaźnikiem sygnału (aktywując zależne od siebie kinazy) bądź stanowi substrat dla fosfohydrolazy kwasu fosfatydowego przekształcając się w DAG. Ilość DAG powstającego w ten sposób przewyższa nawet tę, która powstaje z udziałem PLC [46]. Badania na neuronach embrionów kurzych [51] i komórkach linii CHO  $\kappa 18$  [4] wskazują, że możliwa jest sytuacja, w której opioidy, nie wpływając na aktywność PLC, regulują aktywność odpowiednich kinaz białkowych C (zależnych od DAG) za pośrednictwem PLD. Niektóre izoformy PKC, tzw. konwencjonalne PKC, mogą być też aktywowane przez wolne kwasy tłuszczowe, np. kwas arachidonowy uwalniany przez  $PLA_2$  [46].  $PLA_2$  z kolei może być poddana wpływom, zarówno pobudzającym jak i hamującym, agonistów receptorów opioidowych  $\mu$ . Tego rodzaju działanie opioidów stwierdzono m.in. w niektórych obszarach mózgu szczurów [12, 71], w jelicie biodrowym świńek morskich [7, 8], czy też w komórkach CHO [23]. Nie można jednak wykluczyć, że w doświadczeniu z komórkami ziarnistymi świń FK 33-824 użyty był w dawce zbyt niskiej ( $10^{-9}$  M) by spowodować odpowiedź PLC. Na podstawie badań na komórkach linii COS-7 wiadomo, że dawka opioidu niezbędna do wywołania takiej odpowiedzi jest ok. 50-krotnie wyższa [42] niż ta, która spowodowała zahamowanie aktywności cykazy adenylnowej w tym doświadczeniu. Brak wpływu FK 33-824 ( $10^{-9}$  M) na komórki ziarniste i hamowanie przez niego aktywności PLC w komórkach osłonki wewnętrznej wskazuje na istnienie różnic w mechanizmie działania opioidu w obu typach komórek pęcherzyka jajnikowego świni (rys. 1 i 2).

Uwolnienie jonów  $Ca^{2+}$  pod wpływem  $IP_3$  i DAG w wyniku działania PLC lub PLD prowadzi do uaktywnienia kinaz białkowych C. Jedenaście poznanych dotychczas izoform PKC tworzy trzy podrodziny kinaz C: konwencjonalne (cPKC –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$ ) zależne od jonów  $Ca^{2+}$ , DAG i fosfatydyloseryny; nowe (nPKC –  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) regulowane przez DAG i fosfatydyloserynę oraz atypowe (aPKC –  $\xi$ ,  $\lambda/\tau$ ), zależne jedynie od fosfatydyloseryny [46]. Występowanie PKC w jajniku świń jest niepodważalne [3, 55, 84], nie jest natomiast w pełni zbadane, które izoformy kinazy są w nim obecne. Zahamowanie aktywności PLC przez FK 33-824 w komórkach osłonki wewnętrznej sugeruje, że także aktywność PKC (izoform zależnych od DAG – konwencjonalnych i



nowych) ulega zmniejszeniu. Kolejne doświadczenia z udziałem zarówno komórek ziarnistych, jak i osłonki wewnętrznej wskazują, że ich krótka, kilkugodzinna ekspozycja na opioid może powodować obniżenie aktywności PKC. W pierwszym z nich stwierdzono, że forbol 12-mirystrylo-13-acetylowy (PMA, związek z grupy estrów forboli naśladujący działanie DAG) znosi hamujący wpływ FK 33-824 na steroidogenezę w obu typach komórek. Potwierdzeniem swoistości działania PMA (poprzez PKC) jest fakt, że nieaktywny stereoizomer PMA, 4 $\alpha$ -PDD, nie dawał takich efektów [37, 38]. Podobne osłabienie działania agonistów receptorów  $\mu$  (DAMGO i morfiny) przez – zbliżony w działaniu do PMA – ester forbolu (PDBu; forbol 12,13-dibutyrylowy) zanotowano w testach bólowych przeprowadzonych na myszach [54]. W innym doświadczeniu, opartym na wprost proporcjonalnej zależności między stopniem pobudzenia PKC (izoforn konwencjonalnych lub nowych) a ilością związanego przez struktury komórkowe znakowanego trytem PDBu, zanotowano – w wyniku podania FK 33-824 – obniżenie wiązania <sup>3</sup>[H]PDBu przez komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej (w pierwszym przypadku po upływie 10 min inkubacji, drugim – 3 min). Użyta jako kontrola pozytywna, jonomycyna spowodowała wzrost wiązania <sup>3</sup>[H]PDBu przez oba typy komórek. W następnym doświadczeniu stwierdzono, że trzy przebadane inhibitory PKC: staurosporyna (działająca poprzez domenę katalityczną enzymu), D-sfingozyna (łącząca się z domeną regulatorową) i PKCi (będąca pseudosubstratem) hamują steroidogenezę w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni, naśladując działanie FK 33-824 [37, 38]. Podobny efekt osiągnięto dezaktywując PKC poprzez 36-godzinną inkubację komórek w obecności dużej dawki PMA (rzędu 10<sup>-6</sup> M), w wyniku której następuje enzymatyczna degradacja enzymu [46]. Uzyskane w ten sposób komórki (ang. *PKC-deficient cells*) produkowały znacznie mniej hormonów steroidowych niż komórki z aktywną kinazą C. Dodanie opioidu do komórek pozbawionych aktywnej PKC bądź inkubowanych w obecności inhibitorów tego enzymu powodowało dalsze obniżenie sekrecji steroidów [37, 38]. Może to wskazywać na wykorzystanie – oprócz PKC zależnych od DAG (cPKC lub nPKC), na co wskazuje skuteczne działanie PMA i PDBu we wcześniejszych doświadczeniach – także atypowych kinaz C (niezależnych od DAG i estrów forboli). Głębszą analizę tego problemu utrudnia nieznamość izoforn PKC występujących w jajniku świni. Innym wyjaśnieniem opisanego wyżej hamowania steroidogenezy może być zaangażowanie w mechanizm działania opioidu dodatkowego szlaku transmisji sygnału, np. AC/PKA. Wykorzystanie przez opioidy obu kaskad sygnałowych, angażujących kinazy białkowe A i C, zostało wcześniej zaobserwowane w mózgu szczurów [71] oraz komórkach linii COS i CHO [28]. Do podobnych wniosków prowadzą dane opublikowane przez Smitha i wsp. [74] wskazujące, że tolerancja na morfinę u myszy może być w pełni zniesiona jedynie po równoczesnym zastosowaniu inhibitorów PKA i PKC.

Udział szlaku AC/PKA w mechanizmie działania opioidów w komórkach układu nerwowego wydaje się być dobrze poznany, często bywa wręcz wykorzystywany jako rodzaj kontroli doświadczeń ukierunkowanych na badanie działania opioidów na poziomie subkomórkowym [41, 85]. Pierwszym enzymem efektorowym w tym szlaku jest cyklaza adenylanowa przekształcająca ATP w cykliczny 3',5'-adenozyno-mono-fosforan (cAMP), który aktywuje PKA łącząc się z jej jednostkami regulatorowymi i

uwalniając jednostki katalityczne. Obecność enzymów tego szlaku wykazano w strukturach jajnika świni [15]. Zmniejszenie sekrecji cAMP przez komórki ziarniste [33, 37] i osłonki wewnętrznej [38] pod wpływem FK 33-824, w trakcie dwugodzinnej inkubacji, wskazuje na hamowanie aktywności AC w wyniku działania opioidu. Podobny, hamujący wpływ opioidów zanotowano w komórkach lutealnych [1, 40] i kory nadnerczy [39] gryzoni. Wydłużenie do 4 godzin ekspozycji na opioid obu typów komórek pęcherzyka jajnikowego świni spowodowało zanik hamującego wpływu FK 33-824 [33, 37, 38]. Przyczyną tej reakcji może być obserwowana na innych modelach doświadczalnych [10, 19, 79, 81, 82] zmiana odpowiedzi AC z hamującej na pobudzającą w następstwie długotrwałego podawania opioidów. Sugestia, że podobny proces zachodzi w pęcherzyku jajnikowym, znajduje potwierdzenie w wynikach doświadczenia przeprowadzonego na dużych komórkach lutealnych świń, których dwunastogodzinna inkubacja z FK 33-824 doprowadziła do pobudzenia AC [35]. Można zatem przypuszczać, że wydłużenie czasu inkubacji komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej z opioidem powyżej 4 godzin dałoby zbliżony efekt. Z badań przeprowadzonych na komórkach układu nerwowego i komórkach linii COS-7, CHO lub NG 108-15 wiadomo, że minimalny czas ekspozycji komórek na opioidy, wywołujący wzrost aktywności AC, wynosi 6–10 godzin. Przyczyną aktywacji AC może być m.in. oddziaływanie na ten enzym białek  $G_s$  lub podjednostek  $\beta\gamma$  białek  $G_i$  [47, 85].

Obniżenie aktywności AC w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni pod wpływem FK 33-824 pozwala sądzić, że także aktywność kolejnego w tej kaskadzie enzymu, PKA ulega zahamowaniu. Doświadczenia z udziałem aktywatora (8BrcAMP) i inhibitora (PKAi) kinazy białkowej A potwierdzają tę sugestię. W pierwszym z nich, FK 33-824 znosił stymulujący wpływ 8BrcAMP na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej, w następnym – inhibitor PKA, w sposób zbliżony do opioidu, hamował wytwarzanie steroidów. Podobnie jak w przypadku wspólnego użycia FK 33-824 oraz inhibitorów PKC, także po zastosowaniu opioidu z inhibitorem PKA obserwowano silniejsze hamowanie sekrecji steroidów przez inkubowane komórki w porównaniu z efektem odrębnego działania tych czynników [33, 37, 38]. Potwierdza to, wysuniętą wcześniej tezę, zaangażowania w mechanizm działania opioidu więcej niż jednej kaskady sygnałowej.

Jednoczesne uruchomienie dwóch szlaków transmisji sygnału, co – jak się wydaje – ma miejsce w opisywanych badaniach, stanowi podstawę do wystąpienia interakcji (ang. *cross-talk*) między nimi. Istnieją podstawy, by twierdzić, że AC i PKA mogą być fosforylowane przez PKC [46] i odwrotnie – PKC może być substratem dla PKA [11]. Można nawet przypuszczać, że opisywany wcześniej wzrost aktywności AC wskutek długotrwałego podawania opioidów mógł wynikać z fosforylacji cykazy przez PKC, której aktywność także wzrasta po dłuższej ekspozycji komórek na opioidy. Fosforylacja AC prowadzi z kolei do jej „uwrażliwienia” na białka  $G_{s\alpha}$  i  $G_{\beta\gamma}$  [47]. Przytoczone dane wydają się wskazywać, że interpretacja danych eksperymentalnych wymaga wzięcia pod uwagę możliwości występowania interakcji pomiędzy szlakami uczestniczącymi w mechanizmie przekazywania sygnału indukowanego przez opioidy w komórkach docelowych.



## PODSUMOWANIE

Opioidy, działające za pośrednictwem receptorów  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$ , wpływają na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej dużych pęcherzyków jajnikowych świń. Podczas krótkiej inkubacji tych komórek z opioidami ma miejsce hamowanie podstawowej, niestymulowanej przez LH steroidogenezę. W obecności LH w środowisku komórkowym generalnie następuje zanik hamującego działania opioidów lub pojawienie się stymulacji sekrecji steroidów pod ich wpływem. Wydaje się, że efekt obniżenia podstawowej steroidogenezę, w przypadku opioidów działających poprzez receptory  $\mu$ , osiągnany jest w wyniku hamowania PKC, AC i PKA w komórkach ziarnistych oraz PLC, PKC, AC i PKA w komórkach osłonki wewnętrznej. Można przypuszczać, że w komórkach ziarnistych, w działaniu agonistów receptorów  $\mu$ , pośredniczą (zamiast PLC) inne fosfolipazy – D i  $A_2$ . Pozostaje do wyjaśnienia udział innych szlaków transmisji sygnału w mechanizmie działania opioidów, np. kinaz aktywowanych mitogenem, zbadanie interakcji pomiędzy szlakami, a także stwierdzenie ewentualnych różnic w transmisji sygnału w następstwie łączenia się opioidów z różnymi receptorami ( $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$ ).

## Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania prof. dr hab. Jadwidze Przała, prof. dr hab. Stanisławowi Okrasie, dr Gabrieli Siawrys i dr Iwonie Bogackiej za wszechstronną pomoc, życzliwość oraz stworzenie w pracy bardzo dobrej atmosfery.

## LITERATURA

- [1] ABRAMOWITZ J, CAMPBELL A. Enkephalin-mediated inhibition of forskolin-stimulated rabbit luteal adenylyl cyclase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **116**: 574–580.
- [2] ALEEM F, OMAR RA, TABBAKH GH. Immunoreactive  $\beta$ -endorphin in human ovaries. *Fertil Steril* 1986; **45**: 507–511.
- [3] ASAKAI R, AKITA Y, TAMURA K, KENMOTSU K, AOYAMA Y. Protein kinase C-dependent down-regulation of basic fibroblast growth factor (FGF-2) receptor by phorbol ester and epidermal growth factor in porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1995; **136**: 3470–3479.
- [4] BANERJEE B, CHROMY BA, BERRY-KRAVISE, HAMMOND D, SINGH JK, DAWSON G. Stable expression and heterologous coupling of the kappa opioid receptor in cell lines of neural and nonneural origin. *Life Sci* 1996; **58**: 1277–1284.
- [5] BARB CR, KRAELING RR, RAMPACEK GB. Opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in domestic farm animals. *Dom Anim Endocrinol* 1991; **8**: 15–27.
- [6] BARG J, BELCHEVA MM, ZIMLICHMAN R, LEVY R, SAYA D, MCHALE RJ, JOHNSON FE, COSCIA CJ, VOGEL Z. Opioids inhibit endothelin-mediated DNA synthesis, phosphoinositide turnover, and  $Ca^{2+}$  mobilization in rat C6 glioma cells. *J Neurosci* 1994; **14**(10): 5858–5864.
- [7] CAPASSO A, SORRENTINO L. Arachidonic acid and its metabolites are involved in the expression of morphine dependence in guinea-pig isolated ileum. *Eur J Pharmacol* 1997; **330**: 199–204.

- [8] CAPASSO A. Further studies on the involvement of the arachidonic acid cascade in the acute dependence produced by  $\mu$ ,  $\kappa$  and  $\delta$  opioid agonists in isolated tissues. *Neuropharmacology* 1999; **38**: 871–877.
- [9] CHAKRABARTI S, LIU N-J, GINTZLER AR. Reciprocal modulation of phospholipase C $\beta$  isoforms: adaptation to chronic morphine. *PNAS* 2003; **100** (23): 13686–13691.
- [10] CHAKRABARTI S, WANG L, TANG WJ, GINTZLER AR. Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signaling during tolerance/dependence. *Mol Pharmacol* 1998; **54**: 949–953.
- [11] CHIO C-C, CHANG Y-H, HSU Y-W, CHI K-H, LIN W-W. PKA-dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP. *Cell Signall* 2004; **16**: 565–575.
- [12] CHRISTIE MJ, CONNOR M, VAUGHAN CW, INGRAM SL, BAGLEY EE. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; **27**: 520–523.
- [13] CUPO A, MENEZO Y, BUENO L. Enkephalin production by the corpus luteum. *Neuropeptides* 1987; **9**: 237–245.
- [14] DAVIS J S, MAY JV, KEEL BA. Mechanism of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996; **45**: 1351–1380.
- [15] DeMANNO D, HUNZICKER-DUNN M. cAMP-dependent protein kinase isozymes in porcine follicles and corpora lutea. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **80**: 91–104.
- [16] DELL'AQUILA ME, CASAVOLA V, RESHKIN SJ, ALBRIZIO M, GUERRA L, MARITATO F, MINOLA P. Effects of  $\beta$ -endorphin and naloxone on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Develop* 2002; **63**: 210–222.
- [17] DOUGLASS J, COX B, QUINN B, CIVELLI O, HERBERT E. Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian reproductive tissues. *Endocrinology* 1987; **120**: 707–713.
- [18] DUDZIAK M, DZIWIŃSKI T, MAJEWSKI P. Endogenne opioidy – charakterystyka i wybrane funkcje. [w] SOTOWSKA-BROCHOCKA J [red.]. Fizjologia zwierząt. Wybrane zagadnienia. Warszawa, Wydaw. Uniwersytetu Warszawskiego 2001: 125–148.
- [19] ECKHARDT K, NEVO I, LEVY R, MIKUS G, EICHELBAUM M, VOGEL Z. Morphine-related metabolites differentially activate adenylyl cyclase isozymes after acute and chronic administration. *FEBS Lett* 2000; **470**: 309–314.
- [20] EHRENREICH H, STOCK A, SCHULZ R. Opioid in bovinen Luteinzellkulturen. X Veterinar-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 1985, Berlin.
- [21] FACCHINETTI F, RUSPA M, PETRAGLIA F, SEGRE A, FORABOSCO A, GENAZZANI AR. Met-enkephalin enhances FSH-dependent progesterone production from cultured granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **63**: 1222–1224.
- [22] FALETTI A, VIGGIANO JM, GIMENO MAF. Beta-endorphin inhibits prostaglandin synthesis in rat ovaries and blocks induced ovulation. *Prostaglandins* 1995; **49**: 93–103.
- [23] FUKUDA K, KATO S, MORIKAWA H, SHODA T, MORI K. Functional coupling of the  $\delta$ -,  $\mu$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 1996; **67**: 1309–1316.
- [24] GREGORASZCZUK E, SŁOMCZYŃSKA M.  $\beta$ -Endorphin inhibition of progesterone secretion by porcine granulosa cells during follicle development. *Reprod Nutr Dev* 1998; **38**: 227–234.
- [25] HAMADA H, KISHIOKA S, YAMOTO M, NAKANO R. ( $^3$ H)Naloxone binding sites in porcine ovarian follicles and corpora lutea during the ovarian cycle. *Europ J Endocrinol* 1995; **132**: 622–626.
- [26] HAPPOLA O, ŁAKOMY M, YANAIHARA N. Met $^5$ -enkephalin and Met $^5$ -enkephalin-Arg $^6$ -Gly $^7$ -Leu $^8$ -immunoreactive nerve fibers in the pig female reproductive system. *Neurosci Lett* 1989; **101**: 156–162.
- [27] JIN DF, MUFFLY KE, OKULICZ WC, KILPATRICK DL. Estrous cycle- and pregnancy-related differences in expression of the proenkephalin and proopiomelanocortin genes in the ovary and uterus. *Endocrinology* 1988; **122**: 1466–1471.
- [28] JOHNSON PS, WANG JB, WANG WF, UHL GR. Expressed mu opiate receptor couples to adenylyl cyclase and phosphatidylinositol turnover. *Neuroreport* 1994; **5**: 507–509.
- [29] KAMIŃSKI T, GAWROŃSKA B, DERECKA K, OKRASA S, PRZAŁA J. Gene expression and peptide localisation for LH/hCG receptor in porcine small and large luteal cells: possible regulation by opioid peptides. *J Physiol Pharmacol* 2000; **51**: 359–368.
- [30] KAMIŃSKI T, OKRASA S, BOGACKA I, SIAWRYS G, PRZAŁA J. Porcine theca cells produce immunoreactive  $\beta$ -endorphin and change steroidogenesis in response to opioid agonist. *Acta Vet Hung* 2001; **49**: 319–329.



- [31] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, OKRASA S, PRZAŁA J. The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Anim Reprod Sci* 2003; **78**: 71–84.
- [32] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, OKRASA S, PRZAŁA J. The influence of opioid peptides on steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Reprod Dom Anim* 2004; **39**: 25–32.
- [33] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, OKRASA S, PRZAŁA J. Udział cykazy adenylnowej i kinazy białkowej A w mechanizmie działania opioidów w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni. Materiały XXXVIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz III Krajowego Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu, Międzyzdroje, 2002.
- [34] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, PRZAŁA J. The physiological role of  $\beta$ -endorphin in porcine ovarian follicles. *Reprod Nutr Dev* 2000; **40**: 63–75.
- [35] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S, PRZAŁA J. Action of the opioid agonist FK 33-824 on porcine small and large luteal cells from the mid-luteal phase: effect on progesterone, cAMP, cGMP and inositol phosphate release. *Anim Reprod Sci* 1999; **56**: 245–257.
- [36] KAMIŃSKI T, PRZAŁA J, OKRASA S, BIAŁŁOWICZ I, FROL A. Androstenedione and estradiol secretion by porcine granulosa cells from small and medium-sized follicles: effects of morphine and naloxone. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Haga, Holandia 1992; **3**: 1142–1144.
- [37] KAMIŃSKI T. Intracellular changes in porcine granulosa cells following treatment with opioid agonist, FK 33-824. *Anim Reprod Sci* 2005 (w druku);
- [38] KAMIŃSKI T. The response of phospholipase C/protein kinase C and adenylyl cyclase/protein kinase A pathways in porcine theca interna cells to opioid agonist FK 33-824. *Dom Anim Endocrinol* 2004; **27**: 379–396.
- [39] KAPAS S, PURBRICK A, HINSON JP. Action of opioid peptides on the rat adrenal cortex: stimulation of steroid secretion through a specific  $\mu$  opioid receptor. *J Endocrinol* 1995; **144**: 503–510.
- [40] KATO T, KUMAI A, OKAMOTO R. Effect of  $\beta$ -endorphin on cAMP and progesterone accumulation in rat luteal cells. *Endocrine J* 1993; **40**: 323–328.
- [41] LAW P-Y, WONG YH, LOH HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; **40**: 389–430.
- [42] LEE JWM, JOSHI S, CHAN JSC, WONG YH. Differential coupling of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors to  $G_{\alpha_s}$ -mediated stimulation of phospholipase C. *J Neurochem* 1998; **70**: 2203–2211.
- [43] LI W-I, WU H, KUMAR AM. Synthesis and secretion of immunoreactive-methionine-enkephalin from rabbit reproductive tissues *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 1991; **45**: 691–697.
- [44] LIEBERHERR M, GROSSE B, MACHELON V. Phospholipase  $C_{\beta}$  and ovarian sex steroids in pig granulosa cells. *J Cell Biochem* 1999; **74**: 50–60.
- [45] LIM AT, LOLAIT S, BARLOW JW, O WS, ZOIS I, TOH BH, FUNDER JW. Immunoreactive  $\beta$ -endorphin in sheep ovary. *Nature* 1983; **303**: 709–711.
- [46] LIU J-P. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **116**: 1–29.
- [47] LIU JG, ANAND KJS. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 2001; **38**: 1–19.
- [48] LOLAIT SJ, AUTELITANO DJ, LIM AT, SMITH AI, TOH BH, FUNDER JW. Ovarian immunoreactive  $\beta$ -endorphin and estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 1985; **117**: 161–168.
- [49] LOLAIT SJ, AUTELITANO DJ, MARKWICK AJ, TOH BH, FUNDER JW. Co-expression of vasopressin with  $\beta$ -endorphin and dynorphin in individual cells from the ovaries of Brattleboro and Long-Evans rats: immunocytochemical studies. *Peptides* 1986; **7**: 267–276.
- [50] LOVEGREN ES, ZIMNISKI SJ, PUETT D. Ovarian contents of immunoreactive  $\beta$ -endorphin and  $\alpha$ -N-acetylated opioid peptides in rats. *J Reprod Fertil* 1991; **91**: 91–100.
- [51] MANGOURA D, DAWSON G. Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C- $\epsilon$  in chicken embryo neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2915–2919.
- [52] MELNER MH, YOUNG SL, CZERWIEC FS, LYN D, PUETT D, ROBERTS JL, KOOS RD. The regulation of granulosa cell proopiomelanocortin mRNA by androgens and gonadotrophins. *Endocrinology* 1986; **119**: 2082–2088.
- [53] MURTHY KS, MAKHLOUF GM. Opioid  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  receptor-induced activation of phospholipase C- $\beta_3$  and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by  $G_{i2}$  and  $G_o$  in smooth muscle. *Mol Pharmacol* 1996; **50**: 870–877.
- [54] NARITA M, OHSAWA M, MIZOGUCHI H, KAMEI J, TSENG LF. Pretreatment with protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate attenuates the antinociception induced by  $\mu$ - but not  $\epsilon$ -opioid receptor agonist in the mouse. *Neuroscience* 1997; **76**: 291–298.

- [55] NOLAND TA, DIMINO MJ. Characterization and distribution of protein kinase C in ovarian tissue. *Biol Reprod* 1986; **35**: 863–872.
- [56] O W-S. The effect of  $\beta$ -endorphin on rat oocyte maturation *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **68**: 181–185.
- [57] OKRASA S, KALAMARZ H, ZIECIK A. Gonadotrophin-releasing hormone release *in vitro* from the stalk median eminence of cyclic and ovariectomized gilts in response to naloxone or morphine. *Anim Reprod Sci* 1995; **40**: 151–163.
- [58] OKRASA S. Udział opioidów w regulacji wytwarzania LH u swni w rónnych okresach aktywności plciowej. *Endokrynologia Polska* 1997; **48** (2): Suplement 5.
- [59] PAN Z.  $\mu$ -Opposing actions of the  $\kappa$ -opioid receptor. *TiPS* 1998; **19**: 94–98.
- [60] PETRAGLIA F, FACCHINETTI F, M'FUTA K, RUSPA M, BONAVERA JJ, GANDOLFI F, GENAZZANI AR. Endogenous opioid peptides in uterine fluid. *Fertil Steril* 1986; **46**: 247–251.
- [61] PETRAGLIA F, SEGRE A, FACCHINETTI F, CAMPANINI D, RUSPA M, GENAZZANI AR.  $\beta$ -Endorphin and met-enkephalin in peritoneal and ovarian follicular fluids of fertile and postmenopausal women. *Fertil Steril* 1985; **44**: 615–621.
- [62] POLZONETTI-MAGNI A, CARNEVALI O, MOSCONI G, NABISSI M, FACCHINETTI F. The pro-opiomelanocortin-derived peptide,  $\beta$ -endorphin, regulates ovarian function in the reproductive lizard, *Podarcis s. sicula* Raf. *Endocrine* 1994; **2**: 665–668.
- [63] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, OKRASA S, SIAWRYS G, BOGACKA I. The content of  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity in porcine corpus luteum (*in vivo*) and the potential roles of progesterone, oxytocin and prolactin in the regulation of  $\beta$ -endorphin release from luteal cells *in vitro*. *Reprod Dom Anim* 2001; **36**: 107–112.
- [64] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S. Large luteal cells are the source of immunoreactive  $\beta$ -endorphin in the pig: effects of hCG and TNF $\alpha$  on its secretion by luteal cells *in vitro*. *Endocrine Reg* 1999; **33**: 117–123.
- [65] PRZAŁA J, GOŁACKA E, OKRASA S, KAMIŃSKI T, VAN PHAN K. Effect of met-enkephalin, PRL, and LH upon progesterone and androstenedione secretion by porcine luteal cells. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Haga, Holandia 1992; **3**: 1175–1177.
- [66] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, BOGACKA I, SIAWRYS G. The role of opioids in porcine corpus luteum function. *J Physiol Pharmacol* 1996; **47** (Supl. 1): 101–110.
- [67] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S. Effect of met-enkephalin analogue and naloxone on progesterone secretion by bovine luteal cells. *Acta Physiol Pol* 1990; **41** (Supl. 34): 217.
- [68] ROEMER D, BUESCHER HH, HILL RC. A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature* 1977; **268**: 547–549.
- [69] SANDERS SL, MELNER MH, CURRY TE JR. Cellular localization of ovarian proopiomelanocortin mRNA during follicular and luteal development in the rat. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 1311–1319.
- [70] SARNE Y, RUBOVITCH V, FIELDS A, GAFNI M. Dissociation between the inhibitory and stimulatory effects of opioid peptides on cAMP formation in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **246**: 128–131.
- [71] SHARMA P, BHARDWAJ SK, SANDHU SK, KAUR G. Opioid regulation of gonadotropin release: role of signal transduction cascade. *Brain Res Bull* 2000; **52**(2): 135–142.
- [72] SŁOMCZYŃSKA M, PIERZCHAŁA-KOZIEC K, GREGORASZCZUK E, MADERSPACH K, WIERZCHOŚ E. The kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: localization in granulosa cells. *Cytobios* 1997; **92**: 195–202.
- [73] SMART D, SMITH G, LAMBERT DG.  $\mu$ -Opioid activates phospholipase C in SH-SY5Y human neuroblastoma cells via calcium-channel opening. *Biochem J* 1995; **305**: 577–582.
- [74] SMITH FL, JAVED RR, ELZEY MJ, DEWEY WL. The expression of a high level of morphine antinociceptive tolerance in mice involves both PKC and PKA. *Brain Res* 2003; **985**: 78–88.
- [75] STASZKIEWICZ J, SKOWROŃSKI MT, OKRASA S, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, PŁONKA KJ, KRAZIŃSKI BE, PRZAŁA J. Ekspresja genu kodującego prodynorfinę w komórkach pęcherzykowych jajnika loszek. XIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Sekcji Płodności i Niepłodności oraz Towarzystwa Biologii Rozrodu, 2004, Białowieża.
- [76] STASZKIEWICZ J, SKOWROŃSKI MT, PŁONKA KJ, KRAZIŃSKI BE, OKRASA S. Ekspresja genu kodującego proenkefalinę w przysadce, ciałku żółtym i pęcherzyku jajnikowym loszek. XIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Sekcji Płodności i Niepłodności, oraz Towarzystwa Biologii Rozrodu, 2004, Białowieża.



- [77] SUZUKI T, KISHIMOTO Y, OZAKI S, NARITA M. Mechanism of opioid dependence and interaction between opioid receptors. *Europ J Pain* 2001; **5** (Suppl A): 63–65.
- [78] SZALAY SZ K, STARK E. Effect of  $\beta$ -endorphin on the steroid production of isolated zona glomerulosa and zona fasciculata cells. *Life Sci* 1981; **29**:1355–1361.
- [79] TSO PH, YUNG LY, WONG YH. Regulation of adenylyl cyclase, ERK1/2, and CREB by  $G_z$  following acute and chronic activation of the delta-opioid receptor. *J Neurochem* 2000; **47**: 1685–1693.
- [80] VARSANO JS, IZHAR M, PERK K, SHEMESH M. Effect of  $\beta$ -endorphin on steroidogenesis by bovine luteal cells. *Reprod Fertil Dev* 1990; **2**: 337–343.
- [81] WANG L, GINTZLER AR. Altered mu-opiate receptor-G protein signal transduction following chronic morphine exposure. *J Neurochem* 1997; **68**: 248–254.
- [82] WANG L, GINTZLER AR. Bimodal opioid regulation of cyclic AMP formation: implications for positive and negative coupling of opiate receptors to adenylyl cyclase. *J Neurochem* 1994; **63**: 1726–1730.
- [83] WESTFALL SD, JOSLYN MI, MAU YH, MAY JV, DAVIS JS. LH stimulates phospholipase C activity in cultured porcine granulosa and theca cells. *Biol Reprod* 1994; **51**: 254–261.
- [84] WHEELER MB, VELDHUIS JD. Purification of three forms of chromatographically distinct protein kinase C from the swine ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **61**: 117–122.
- [85] WILLIAMS JT, MACDONALD JC, MANZONI O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 2001; **81**: 299–343.
- [86] ZERANI M, GOBBETTI A. *In vivo* and *in vitro* studies on effects of  $\beta$ -endorphin and naloxone on sex steroids in the water frog, *Rana esculenta*. *Acta Physiol Scand* 1992; **146**: 271–279.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 01.04.2005 r.*

*Przyjęto: 24.05.2005 r.*

*ul. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn*





## SYGNATURA WAPNIOWA: GENEROWANIE I SPECYFIKA CYTOPLAZMATYCZNEGO SYGNAŁU WAPNIOWEGO\*

CALCIUM SIGNATURE: GENERATION AND CYTOPLASMIC  
SPECIFICITY OF CALCIUM SIGNAL

Edyta DEJA, Marcin SIKORA, Andrzej TRETYN\*

Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

*Streszczenie:* Jony  $\text{Ca}^{2+}$  stanowią w komórkach wysoce uniwersalne cząsteczki sygnalizacyjne i są integralnymi składnikami wielu szlaków transdukcji sygnałów. Liczne czynniki środowiskowe i rozwojowe oddziałując na komórkę, indukują wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ). W generowanie cytoplazmatycznego sygnału wapniowego zaangażowane są liczne kanały wapniowe, które współdziałając z pompami i kotransporterami wapniowymi wpływają na kształt i specyfikę sygnału  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Czasowo-przestrzenna charakterystyka sygnału  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , zwana także sygnaturą wapniową, koduje informacje determinujące kształt ostatecznej odpowiedzi fizjologicznej komórki. W naszej pracy opisaliśmy mechanizmy uczestniczące w generowaniu specyficznych względem określonych bodźców sygnatur  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  oraz sposoby dekodowania przez komórki roślinne sygnałów wapniowych, które są istotne dla uzyskania właściwej odpowiedzi fizjologicznej.

*Słowa kluczowe:*  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , fale i oscylacje wapniowe, kanały wapniowe, sensory  $\text{Ca}^{2+}$ , sygnatura wapniowa, kotransportery  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ .

*Summary:* Calcium ions are highly universal signaling molecules in cells and participate as integral components of many signal transduction pathways. Cell stimulation by various environmental and developmental cues induces an elevation in cytosolic calcium concentration. Generation of calcium signal engages numerous calcium channels. Their interaction with cellular  $\text{Ca}^{2+}$  removing mechanisms influences the shape and specificity of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Spatio-temporal characteristics of calcium signal, termed as a calcium signature, encode information, which determine the form and shape of cellular physiological response. The subject of this publication is generation of a stimulus specific calcium signature and the way of encoding specificity in calcium signal to produce an appropriate physiological response of a cell.

\*Pracą powstała w trakcie realizacji grantu finansowanego przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika (394-B).

*Keywords:*  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, calcium channels,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , calcium signature,  $\text{Ca}^{2+}$  sensors, calcium waves and oscillations,  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  cotransporters.

## 1. WPROWADZENIE

Pomiędzy każdą żywą komórką a jej otoczeniem zachodzi nieustający przepływ informacji. Wymiana informacji i sygnałów jest możliwa dzięki temu, że każda komórka ma złożone mechanizmy przetwarzające zewnętrzne sygnały na specyficzne odpowiedzi biologiczne. Stąd też procesy sygnalizacji decydują o życiu i śmierci komórki, regulują wzrost, różnicowanie się komórek oraz indukują powstawanie odpowiedzi komórkowych na zmiany zachodzące w środowisku. Odbieranie fizycznych i chemicznych sygnałów umożliwiają receptory – białka zlokalizowane na powierzchni błony komórkowej lub wewnątrz komórki. Receptory wykazują specyficzność względem rozpoznawanych przez nie sygnałów działających indukująco (agoniści) lub hamująco (antagoniści) na ich aktywność. Odbierane przez receptory sygnały wzmacniane są przez różne wewnątrzkomórkowe białka efektorowe i regulatorowe, których aktywność regulowana jest poprzez niskocząsteczkowe związki organiczne (cykliczne nukleotydy, trisfosforan inozytolu) bądź jony  $\text{Ca}^{2+}$ , zwane wtórnymi przekaźnikami informacji (ang. *second messengers*). Wszystkie elementy uczestniczące w przewodzeniu sygnałów od receptora do efektoru tworzą tzw. szlaki transdukcji sygnałów [18, 20].

Sygnalizacja wapniowa jest najbardziej powszechnym w komórce mechanizmem transdukcji sygnału [20, 23]. Funkcje sygnałowe spełniają tylko wolne jony wapnia. W komórkach eukariotycznych stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  waha się w granicach od 0,1 do 10 mmol/l, a rozmieszczenie tego kationu w obrębie poszczególnych organelli komórkowych jest nierównomierne [47]. W stanie spoczynkowym, w cytoplazmie podstawowej komórek roślinnych i zwierzęcych, stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  jest bardzo niskie i przyjmuje wartość od kilkudziesięciu do kilkuset nmol/l. W innych przedziałach subkomórkowych koncentracja  $\text{Ca}^{2+}$  jest dużo wyższa – od 1 mmol/l (w mitochondriach, plastydach i ER) do 10 mmol/l (w wakuoli i ścianie komórek roślinnych). Zewnątrzkomórkowe bodźce aktywujące komórkę, indukują zmiany w poziomie cytoplazmatycznego  $\text{Ca}^{2+}$ . W czasie od kilku do kilkunastu sekund  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  wzrasta z około 200 nmol/l do ponad 1  $\mu\text{mol/l}$  [37].

Generowanie sygnału wapniowego w stymulowanej komórce możliwe jest przez [47]:

- ◆ szybki wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w wyniku ich uwalniania z wewnątrzkomórkowych magazynów (ER, mitochondria, wakuola, jądro komórkowe) i napływu tego kationu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy;
- ◆ aktywację białek wiążących wapń w cytoplazmie podstawowej, co prowadzi do indukcji procesów biologicznych lub aktywacji dalszych etapów łańcucha transdukcji sygnału;
- ◆ szybki spadek cytoplazmatycznego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  do poziomu obserwowanego przed stymulacją komórki.



W komórkach roślinnych jony wapnia pełnią rolę uniwersalnego przekaźnika informacji [41]. Wapń zaangażowany jest m.in. w indukcję wielu procesów rozwojowych (np. wzrost łagiewki pyłkowej [19], rozwój włóśników [4]), w generowanie odpowiedzi na działanie hormonów, np. indukowany auksyną wzrost wydłużeniowy komórki [12], kontrolowane przez kwas absycynowy zamykanie aparatów szparkowych [1]), w indukcję komórkowych procesów obronnych wywołanych przez patogeny i elicytory (np. produkcja reaktywnych form tlenu, synteza fitoaleksyn i hiperwrażliwość [6, 7, 22]), a także w regulację ekspresji genów indukowanych przez stres abiotyczny [23].

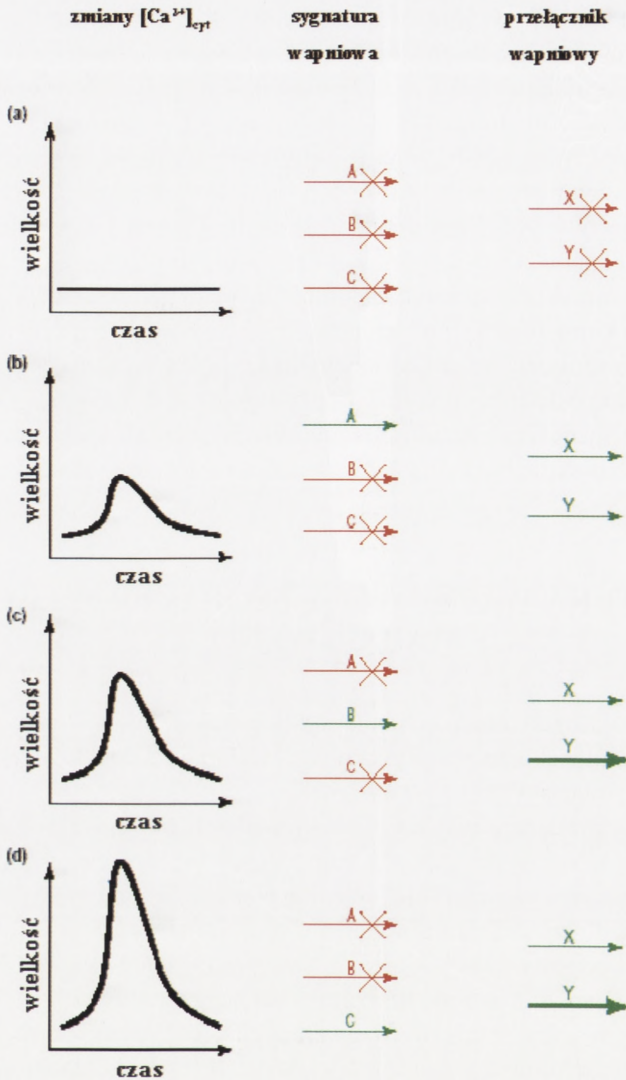
Liczne bodźce biotyczne i abiotyczne oddziałując na komórki roślinne indukują w nich zmiany poziomu  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , co sugeruje, że wapń jest bardzo powszechnym składnikiem wielu odmiennych szlaków sygnalizacyjnych. Aby zrozumieć mechanizm działania  $Ca^{2+}$  w komórkach roślinnych, należy przedstawić informacje, w jaki sposób kształtowana jest specyfika sygnałów wapniowych oraz jak specyficzne względem określonego bodźca sygnały  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  determinują powstanie właściwej odpowiedzi fizjologicznej.

## 2. SYGNATURA WAPNIOWA A TEORIA PRZEŁĄCZNIKA WAPNIOWEGO

Złożona czasowo-przestrzenna charakterystyka sygnału  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , która warunkuje jego specyfikę i w konsekwencji wpływa na wyzwalanie ściśle określonej odpowiedzi komórkowej, nosi miano sygnatury wapniowej.

Badania nad sygnalizacją wapniową w komórkach roślinnych doprowadziły do sformułowania dwóch przeciwstawnych względem siebie hipotez: „sygnatury wapniowej” i „chemicznego przełącznika” [42]. Według pierwszej z nich specyficzne sygnatury wapniowe obserwowane w stymulowanych komórkach, kodują informacje, które modulują końcową odpowiedź fizjologiczną. Natomiast według drugiej z wymienionych hipotez, jony wapnia pełnią jedynie funkcje przełączników aktywujących wrażliwe na  $Ca^{2+}$  elementy odpowiednich szlaków sygnalizacyjnych. W tym przypadku powstanie stosownej odpowiedzi komórkowej możliwe jest dzięki współdziałaniu jonów wapnia z innymi składnikami szlaków transdukcji sygnałów [42]. Założenia hipotez „sygnatury wapniowej” i „przełącznika wapniowego” zilustrowano na rycinie 1.

Na wspomnianej rycinie zmiany poziomu  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  przedstawione zostały dla komórek znajdujących się w stanie spoczynku (a) oraz dla komórek pobudzonych przez trzy różne typy bodźców (b, c, d). W komórkach spoczynkowych, charakteryzujących się niskim poziomem  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szlaki sygnalizacyjne zależne od tego jonu są nieaktywne. Zgodnie z hipotezą „sygnatury wapniowej”, gdy poziom  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  wzrasta od wartości (b) do wartości (d), każda z powstających w ten sposób trzech różnych sygnatur wapniowych prowadzi do aktywacji tylko jednego specyficznego szlaku: A, B lub C. Tym samym każdy z tych szlaków sygnalizacyjnych aktywowany jest przez określoną, specyficzną sygnaturę wapniową (ryc. 1). Natomiast zgodnie z hipotezą „przełącznika wapniowego”, jakakolwiek zmiana poziomu  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , przekraczająca wartość progową



RYCINA 1. Funkcja sygnalizacyjna wapnia wg teorii „sygnatury wapniowej” i „przełącznika wapniowego”. (na podstawie [42], zmodyfikowane). Wykresy (b–d) przedstawiają różne wzory cytoplazmatycznych sygnałów  $Ca^{2+}$ . Czerwone strzałki oznaczają nieaktywne ścieżki sygnalizacyjne, zaś zielone to aktywne szlaki transdukcji informacji. Grubość strzałek wskazuje na „intensywność” uzyskanej odpowiedzi komórkowej; dalszy opis w tekście

(b), aktywuje szlaki X i Y. Jednakże siła uzyskanej odpowiedzi komórkowej zależy jedynie od wielkości wzrostu stężenia  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  i dla szlaku Y jest ona zdecydowanie większa w przypadku (c) niż (b). Z drugiej strony, sygnatura wapniowa przedstawiona w punkcie (d) nie wpływa już na wielkość odpowiedzi generowanej za pośrednictwem szlaku Y (ryc. 1) [42].



Mimo iż wyżej opisane hipotezy dotyczące mechanizmu działania  $\text{Ca}^{2+}$  mają przeciwny charakter przypuszcza się, że obie formy sygnalizacji: „sygnatury wapniowej” i „przełącznika wapniowego” mogą równolegle funkcjonować w komórkach roślinnych [42].

### 3. SYGNATURA WAPNIOWA A ODPOWIEDŹ FIZJOLOGICZNA KOMÓRKI

W komórce roślinnej wywołanie specyficznej względem danego bodźca odpowiedzi fizjologicznej zachodzi przez [38]:

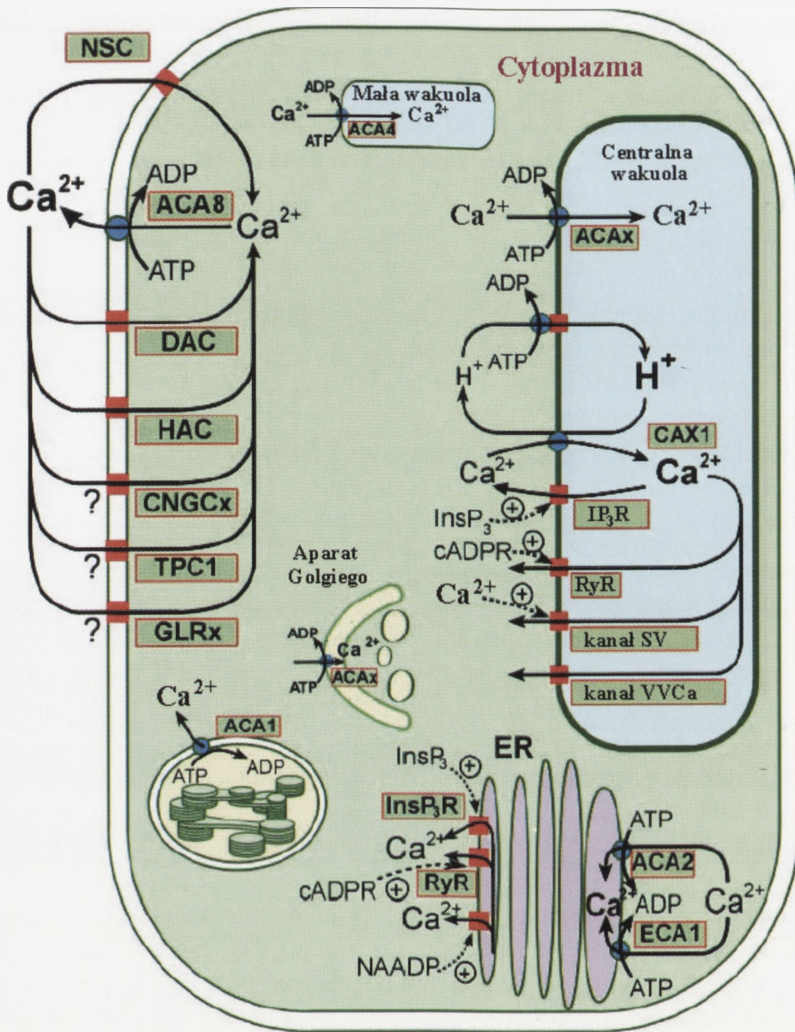
- (1) generowanie w cytoplazmie specyficznej sygnatury wapniowej w odpowiedzi na określony bodziec odebrany przez komórkę;
- (2) dekodowanie sygnatury wapniowej przez sensory  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- (3) transdukcję informacji „zapisanej” w sygnaturze wapniowej do elementów docelowych szlaku, które uczestniczą w powstawaniu fizjologicznej odpowiedzi komórki.

#### 3.1. Generowanie sygnatury wapniowej

Podstawowym warunkiem umożliwiającym generowanie specyficznej względem danego bodźca sygnatury wapniowej jest współdziałanie różnych białek kontrolujących napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z apoplastu do cytoplazmy i ich uwalnianie z wewnątrzkomórkowych magazynów [31] oraz regulujących usuwanie tych kationów z cytoplazmy do apoplastu i do wnętrza różnych organelli [11, 31]. Do wspomnianych białek należą zlokalizowane w błonach kanały i pompy wapniowe oraz kotransportery  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (ryc. 2). W zależności od rodzaju bodźca działającego na komórkę, wzrost  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  indukowany jest przez aktywację różnego typu kanałów wapniowych. Występujące w błonie plazmatycznej roślinne kanały wapniowe sklasyfikowane zostały ze względu na ich wrażliwość na zmiany potencjału błonowego. Na tej podstawie wyróżniono kanały aktywowane przez depolaryzację (DAC) lub hiperpolaryzację (HAC) tej błony oraz kanały kationowe niezależne od napięcia. Do tej ostatniej grupy zaliczono kanały aktywowane przez cykliczne nukleotydy (CNGC) oraz działające jako receptory glutaminianu (GLR) (ryc. 2).

W roślinnych błonach komórkowych bardzo powszechne są także aktywowane przez depolaryzację kanały mające dwa pory (TPC) [41]. Wszystkie wymienione kanały w stanie aktywacji uczestniczą w przewodzeniu jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytozolu. Sposoby regulacji aktywności tych kanałów, podobnie jak ich komórkowa lokalizacja, wpływają na przestrzenną i czasową charakterystykę sygnałów  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  [20, 41].

Poza jonami wapnia pochodzącymi ze środowiska zewnątrzkomórkowego, w generowanie specyficznych, cytozolowych sygnałów  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  zaangażowane są jony  $\text{Ca}^{2+}$  zgromadzone w wewnątrzkomórkowych magazynach. W komórce roślinnej podstawowym magazynem  $\text{Ca}^{2+}$  jest wakuola. Tonoplast wyposażony jest w liczne kanały, uczestniczące w uwalnianiu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do cytozolu [41]. Są to kanały aktywowane przez depolaryzację błony, z których najbardziej powszechnym typem są kanały SV [49], dwa typy kanałów aktywowanych przez hiperpolaryzację błony oraz



RYCINA 2. Schemat przedstawiający główne mechanizmy transportujące jony  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce roślinnej na przykładzie *Arabidopsis thaliana* (na podstawie [41], zmodyfikowane). Niebieskie okręgi reprezentują systemy transportujące jony Ca: (1) aktywnie: ACA – autoinhibitorowa ATPaza wapniowa, ECA – ATPaza wapniowa występująca w obrębie ER, (2) biernie: CAX – kotransporter wapniowo-protonowy ( $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ) zlokalizowany w błonie wakuolarniej. Czerwone kwadraty reprezentują kanały przewodzące jony wapnia: zlokalizowane w błonie plazmatycznej (NCS – nieselektywne kanały kationowe, DAC – kanały aktywowane przez depolaryzację błony, HAC – kanały aktywowane przez hiperpolaryzację błony, TPC – kanały mające dwa pory, CNGCx – kanały aktywowane przez cykliczne nukleotydy, GLRx – receptory glutaminianu) oraz w endomembranach (VVCa – wakuolarnie napięciowo zależne kanały  $\text{Ca}^{2+}$ , SV – wolno aktywowane kanały wakuolarnie oraz receptory: IP<sub>3</sub>R (nazwa związku), RyR (rianodinowe) i NAADP (nazwa związku). Dalszy opis w tekście



wysoce selektywne względem  $\text{Ca}^{2+}$  kanały aktywowane przez cytozolowe wtórne przekaźniki informacji (ryc. 2). Należą do nich: receptory 1,4,5-trisfosfoinozytolu ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) aktywowane przez  $\text{IP}_3$  oraz receptory rianodinowe aktywowane przez cADPR [41, 49]. Poza wakuolą innym magazynem wapniowym jest ER. Uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  do cytozolu zachodzi poprzez błonowe kanały aktywowane wtórnymi przekaźnikami informacji –  $\text{IP}_3$  [32], cADPR [34] i NAADP [33] (ryc. 2).

Obecność w komórce wielu typów kanałów zaangażowanych w generowanie cytoplazmatycznych sygnałów wapniowych, umożliwia osiągnięcie czasowo-przestrzennej specyfiki wzrostu  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  poprzez rekrutację kanałów o odmiennych właściwościach, odrębnej lokalizacji i różnym sposobie regulacji aktywności (ryc. 2) [50].

W kształtowaniu specyficznej czasowo-przestrzennej charakterystyki sygnału  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  uczestniczą także białka regulujące usuwanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z cytozolu, czyli pompy wapniowe i kotransportery  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . Zlokalizowane są one w różnych błonach komórkowych. Uczestniczą w aktywnym (pompy) i pasywnym (kotransportery) transporcie jonów wapniowych z cytoplazmy do środowiska zewnątrzkomórkowego lub do magazynów  $\text{Ca}^{2+}$ . Usuwanie jonów wapnia do poziomu obserwowanego w cytoplazmie komórek spoczynkowych umożliwia ponowne generowanie lokalnych sygnałów  $\text{Ca}^{2+}$ , odnawianie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, a także kształtuje wielkość, kinetykę i wewnątrzkomórkową lokalizację sygnatur wapniowych [45]. Pompy wapniowe ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy), które mają wysokie powinowactwo ( $K_m = 1\text{--}10 \mu\text{M}$ ), ale niską pojemność transportową względem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  w komórce w stanie spoczynkowym [21]. Roślinne  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy należą do dwóch głównych rodzin IIA i IIB [10]. Rodzinę IIA stanowią zlokalizowane w błonie plazmatycznej, tonoplaście, błonie ER i aparacie Golgiego ATPazy typu P pozbawione N-terminalnej domeny autoregulatorowej. Natomiast w skład rodziny IIB tej grupy ATPaz wchodzi enzymy charakteryzujące się obecnością N-terminalnej domeny autoinhibitorowej, która zawiera miejsce wiązania  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmoduliny (CaM) i ulegającą fosforylacji resztę serynową [10]. Ich aktywność katalityczna może być modulowana przez zmiany  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , a także poprzez wiązanie kalmoduliny (aktywacja). Inhibicja pomp zachodzi w drodze fosforylacji przeprowadzanej przez zależną od  $\text{Ca}^{2+}$  kinazę białkową (CDPK) [50]. Pompy wapniowe występują zarówno w błonie komórkowej, jak i błonach otaczających różne organelle (ryc. 2), a ich poszczególne izoformy są funkcjonalnie odmienne i wykazują zróżnicowane powinowactwo względem jonów wapnia [50].

Kotransportery  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  w porównaniu z pompami wapniowymi mają niższe powinowactwo ( $K_m = 10\text{--}15 \mu\text{M}$ ), ale wysoką pojemność transportową względem jonów wapnia. Występujące w błonie plazmatycznej i tonoplaście kotransportery  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (ryc. 2) uczestniczą w usuwaniu nadmiaru jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy poza komórkę i do wnętrza wakuoli [41]. Stechiometria transportu jonów jest różna dla obu wymienionych typów kotransporterów. I tak usunięciu 1 mola  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy do wnętrza wakuoli towarzyszy przeniesienie przez tonoplast od 1 do 3 moli  $\text{H}^+$  w przeciwnym kierunku. Aktywność wymiennicza  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  może być regulowana przez autoinhibitorową 10-aminokwasową domenę znajdującą się na końcu N teo białka [36].

### 3.2. Forma i specyfika sygnatur $[Ca^{2+}]_{cyt}$

Różne bodźce działające na komórkę generują zmiany poziomu  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  o określonej czasowo-przestrzennej charakterystyce poprzez: uwalnianie jonów wapnia z różnych komórkowych magazynów i aktywację kanałów wapniowych o odmiennych właściwościach i odrębnej komórkowej lokalizacji. Decydujące znaczenie dla kodowania informacji w specyficznej sygnaturze wapniowej mogą mieć różnice wynikające z charakterystycznej dla danego bodźca kinetyki wzrostu cytoplazmatycznego poziomu  $[Ca^{2+}]$  [35]. Powstające w wyniku pobudzenia komórek roślinnych sygnały wapniowe mogą mieć postać tzw. gorących punktów (ang. *quarks*, *blips*), „pyknięć” (ang. *puffs*), „iskierek” (ang. *sparks*), oscylacji lub fal [35]. Niski poziom stymulacji komórki powoduje aktywację pojedynczych kanałów wapniowych, co prowadzi do małych, lokalnych wzrostów  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , określanych jako „*quarks*” i „*blips*”. Uwalnianie do cytozolu jonów  $Ca^{2+}$ , będące wynikiem wyższego stopnia stymulacji prowadzi do powstania sygnałów mających formę „pyknięć” i „iskierek” wapniowych. Tego typu przestrzennie i czasowo rozdzielone wydarzenia elementarne mogą uczestniczyć w generowaniu globalnych sygnałów, np. fal wapniowych. Przykładem istotnej roli wydarzeń elementarnych w sygnalizacji wapniowej mogą być wyniki badań przeprowadzonych na komórkach jajowych *Fucus serratus* [15]. W komórkach tej brunatnicy stres hiperosmotyczny indukował wzrost  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  w dyskretnych domenach w obrębie cytozolu. Wzrosty  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  rzędu 200–300 nM obserwowane przez okres 15–30 ms miały charakter periodyczny i były przestrzennie rozdzielone rejonami cytoplazmy charakteryzującymi się obniżonym poziomem  $[Ca^{2+}]$  [15].

**Pojedyncze i dwufazowe wzrosty  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ .** Czynniki abiotyczne, takie jak: nagle obniżenie temperatury, stres mechaniczny, oddziałując na różne komórki roślinne (np. *Arabidopsis thaliana* [25]) wywołują nagłe, pojedyncze i krótkotrwałe skoki poziomu  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , po których w ciągu kilku minut stężenie wolnego cytoplazmatycznego  $Ca^{2+}$  powraca do wartości rejestrowanych w komórkach spoczynkowych [25].

W komórkach niektórych roślin, m.in. *Arabidopsis thaliana* [24], w warunkach przedłużonego działania czynnika stresowego obserwuje się pojawienie dwufazowego sygnału  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Długie utrzymywanie się niskiej temperatury indukuje sygnał, w którym po inicjalnym, krótkotrwałym (kilkusekundowym) wzroście  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  następuje drugie, nieco dłuższe (trwające do kilku minut) podwyższenie cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia [24]. Z kolei szok cieplny, stres solny, hiperosmotyczny i oksydacyjny wywołują najpierw kilkuminutowy wzrost  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , po którym dopiero następuje drugi, zdecydowanie dłuższy i utrzymujący się nawet przez wiele godzin [22, 24]. Dwufazowe zmiany cytoplazmatycznego stężenia  $Ca^{2+}$  obserwuje się także w komórkach roślinnych stymulowanych przez patogeny i elicytory [28]. Bodźce te wywołują powolny wzrost  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , a utrzymującemu się przez dłuższy czas podwyższonemu stężeniu jonów wapnia towarzyszy indukcja odpowiedzi obronnej komórki [28].

**Fale wapniowe.** Fale wapniowe stanowią formę globalnego sygnału  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , który wyzwany jest przez nagromadzenie w obrębie małego regionu cytoplazmy pojedynczych wzrostów  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , co w następstwie prowadzi do wystąpienia zjawiska nazywanego indukowanym przez wapń uwalnianiem  $Ca^{2+}$  (CICR) z jego wewnątrz-



komórkowych magazynów [3]. Powstały w wyniku indukcji tego procesu sygnał może przybierać formę przestrzenne rozchodzącej się fali wapniowej [46]. Powstawanie tego typu fal pozwala na propagowanie specyficznych czasowo-przestrzennych zmian  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , które różnią się: amplitudą, komórkową lokalizacją i zasięgiem [30]. Różnorodne formy, jakie przybierają fale wapniowe, mogą determinować powstawanie specyficznej dla danego bodźca fizjologicznej odpowiedzi komórki [15].

**Oscylacje wapniowe.** Oscylacje wapniowe generowane w cytozolu, składają się z regularnych faz wzrostów i spadków  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Fazy wzrostu wymagają zarówno napływu  $Ca^{2+}$  ze środowiska zewnątrzkomórkowego przez błonę plazmatyczną, jak i uwalniania wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych (wakuoli, ER) do cytozolu. Fazy spadku koncentracji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  związane są z „pompowaniem” jonów wapnia poza błonę plazmatyczną i jego ponownym gromadzeniem w wewnątrzkomórkowych magazynach  $Ca^{2+}$  [5]. Powstawanie oscylacji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  zachodzi więc poprzez skoordynowaną interakcję pomiędzy błonowymi kanałami wapniowymi a  $Ca^{2+}$ -ATPazami i kotransporterami  $Ca^{2+}/H^+$  [48]. Uważa się, że oscylacje  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  umożliwiają kodowanie informacji w postaci ich amplitudy i częstotliwości [11]. Z badań prowadzonych nad sygnalizacją wapniową w komórkach roślinnych wynika, że kilka czynników środowiskowych i rozwojowych, oddziałując na komórkę, indukuje oscylacje  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , które różnią się: amplitudą, częstotliwością i czasem trwania, zaś ich forma zależy od siły oddziaływania i kombinacji specyficznych bodźców [11]. Periodyczność oscylacji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  obserwowanych w komórkach roślinnych zmienia się od: oscylacji powolnych występujących w komórkach kolecyptyli na skutek stymulacji auksyną (period = 30 min) [12], poprzez oscylacje indukowane w komórkach aparatów szparkowych stymulowanych przez ABA, egzogenne podawany  $Ca^{2+}$ , ozon i elicytory (gdzie period > 3 min) [16], do szybkich oscylacji pojawiających się w wierzchołkowej części rosnącej łagiewki pyłkowej (period = 40–75 s) [30, 40].

Jak do tej pory najlepiej poznano zjawisko powstawania oscylacji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  w komórkach aparatów szparkowych poddawanych działaniu kwasu abscysynowego (ABA) i egzogenne  $Ca^{2+}$ . Stwierdzono, że w komórkach szparkowych *Arabidopsis thaliana* i *Vicia faba* oscylacje  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  pojawiają się w warunkach naturalnych, jednak są one słabe i nieregularne. Oscylacje cytoplazmatycznego  $Ca^{2+}$  uzyskują silną i regularną formę dopiero w wyniku działania zewnątrzkomórkowych bodźców [2]. W generowanie oscylacji wapniowych w komórkach szparkowych zaangażowane są: napięciowozależne kanały  $Ca^{2+}$  obecne w błonie komórkowej i w błonach otaczających wewnątrzkomórkowe magazyny wapnia (kanały typu VVCa i SV) oraz kanały wrażliwe na wtórne przekaźniki informacji ( $IP_3$ , cADPR i NAADP), które uwalniają  $Ca^{2+}$  z magazynów wapniowych. Wszystkie te kanały kontrolują napływ jonów wapnia do cytozolu. W usuwaniu podwyższonego stężenia  $Ca^{2+}$  z cytoplazmy uczestniczą pompy wapniowe i kotransportery  $Ca^{2+}/H^+$ , które tym samym odpowiedzialne są za fazę spadku koncentracji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  [51].

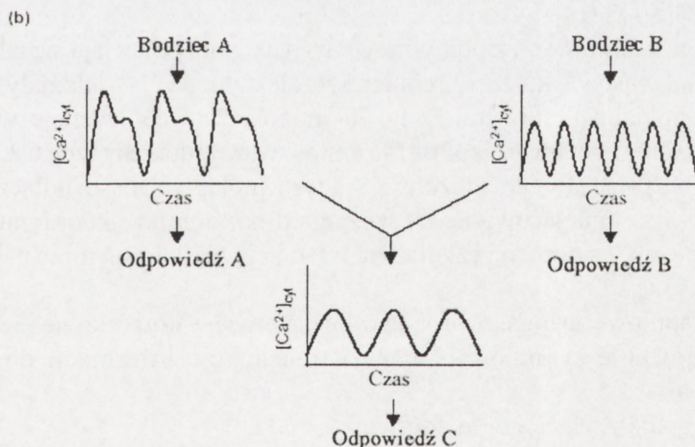
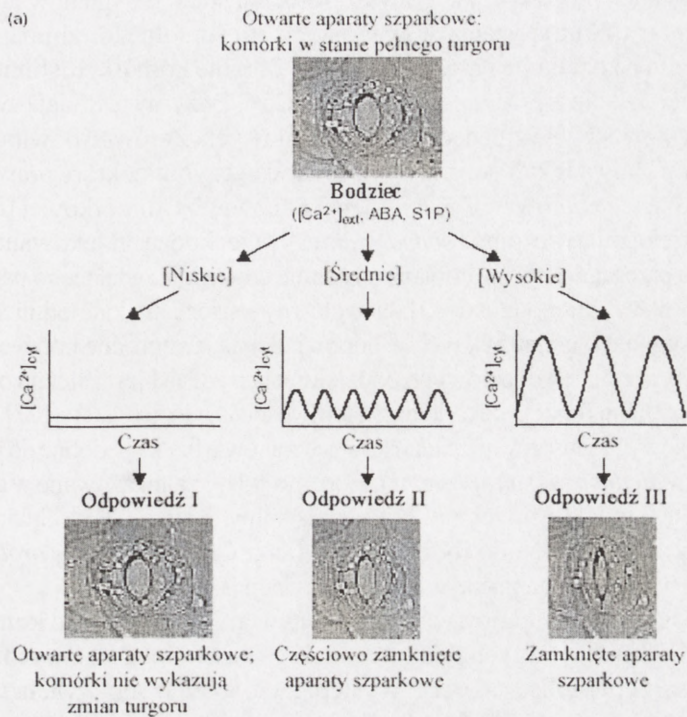
Złożona czasowo-przestrzenna charakterystyka (sygnatura) oscylacji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  koduje specyficzne względem bodźca informacje. Informacje kodowane przez sygnał  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  zawierają dwie składowe: pierwszą związaną z szybką reakcją i drugą umożliwiającą programowanie fizjologicznej reakcji komórki. W przypadku aparatów szparkowych komponent sygnału  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  związany z szybką reakcją pojawia się natychmiastowo

po zadziałaniu bodźca (np. ABA) i koduje informacje inicjujące zamykanie aparatów szparkowych. Przybiera on zazwyczaj formę krótkotrwałego wzrostu  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Komponent sygnału wapniowego związany z programowaniem reakcji koduje informacje umożliwiające utrzymanie aktualnego stanu aparatu szparkowego (np. stanu zamknięcia) i zazwyczaj przybiera formę serii oscylacji [2]. Wzorzec oscylacji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  jest bezpośrednio związany z siłą stymulacji i w efekcie wpływa na siłę wyzwolonej odpowiedzi fizjologicznej, którą w omawianym przypadku jest zamykanie aparatów szparkowych (ryc. 3a). Komórki szparkowe mogą poza tym integrować informacje pochodzące od oscylacji  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  wyzwalanych w odpowiedzi na kilka bodźców (ryc. 3b). W tego typu komórkach roślinnych dochodzi więc do powstawania jednej ostatecznej sygnatury wapniowej. Reguluje ona uzyskanie odpowiedzi komórkowej, która jest wynikiem dekodowania oscylacyjnych zmian  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  przez sensory wapniowe – zależne od  $Ca^{2+}$  fosfatazy [11]. Obecnie sugeruje się, że w komórkach szparkowych funkcjonować mogą zarówno kinazy zależne (CDPK), jak i niezależne od jonów  $Ca^{2+}$ , jednak rola CDPK w procesie kształtowania odpowiedzi komórkowych nie została jeszcze wyjaśniona [50]. Aktywność kinaz i fosfataz białkowych reguluje procesy fosforylacji i defosforylacji białek w komórkach szparkowych. Oscylacje o niskiej częstotliwości warunkują wzrost liczby białek w formie ufosforylowanej, podczas gdy oscylacje  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  o wyższej częstotliwości utrzymują podwyższony poziom białek zdefosforylowanych. Specyficzna równowaga pomiędzy frakcją białek zdefosforylowanych, a ufosforylowanych wpływa na kształt odpowiedzi fizjologicznej [31].

### 3.3. Dekodowanie sygnatury $[Ca^{2+}]_{cyt}$

Dekodowanie sygnatury wapniowej i generowanie specyficznej względem sygnału  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  odpowiedzi komórkowej wymaga aktywacji określonych typów białek wiążących  $Ca^{2+}$  [50]. Są to tzw. sensory wapniowe i białka docelowe dla tych sensorów. Odbiór sygnału wapniowego zachodzi poprzez wiązanie  $Ca^{2+}$  do sensorów wapniowych: odpowiadających lub przekaźnikowych [41]. Sensory odpowiadające (ang. *sensor responders*) podlegają indukowanym przez  $Ca^{2+}$  konformacyjnym zmianom, które wpływają na ich aktywność. Do tego rodzaju sensorów należy zależna od  $Ca^{2+}$  kinaza białkowa (CDPK) [18]. Enzym ten stanowi jedno z najbardziej powszechnych i specyficznych dla roślin białek [37]. Aktywowany jest przez mikromolowe stężenie wolnego cytoplazmatycznego wapnia. Składa się z domeny katalitycznej i regulatorowej, które oddzielone są przez region zawierający domenę autoinhibitorową. Podczas nieobecności cytoplazmatycznego sygnału wapniowego autoinhibitorowa domena CDPK hamuje aktywność enzymu [17]. Jony wapnia wiązane są przez domenę regulatorową, tzw. kalmodulino-podobną, która ma cztery motywy *EF-hand* [8]. Związanie  $Ca^{2+}$  znosi autoinhibicję i przywraca aktywność CDPK, która przez fosforylację różnych białek docelowych reguluje przebieg licznych procesów biologicznych. Wśród zidentyfikowanych do tej pory substratów CDPK znajdują się: transportery błonowe (np.  $Ca^{2+}$ -ATPazy), kanały jonowe (np. w komórkach aparatów szparkowych [51]), oksydazy NADPH, enzymy zaangażowane w metabolizm węgla i azotu, proteazy, białka cytoszkieletu oraz białka wiążące DNA [8,37]. Kinazy zależne od  $Ca^{2+}$  regulują u





RYCINA 3. Schemat przedstawia zależność pomiędzy sygnaturą wapniową a specyfiką uzyskanej odpowiedzi fizjologicznej w komórkach aparatów szparkowych (stymulowanych i znajdujących się w stanie spoczynku). (na podstawie [11], zmodyfikowany). (a) Oscylacje  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  warunkują specyficzną odpowiedź komórkową, przekazując informacje zakodowane w postaci amplitudy i częstotliwości. (b) Komórki aparatów szparkowych zdolne są do integrowania informacji zakodowanych w oscylacjach  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ , indukowanych przez odmienne bodźce komórkowe (A i B). W ten sposób kształtowana jest ostateczna odpowiedź fizjologiczna (C). Dalszy opis w tekście

roślin przebieg takich procesów, jak: grawitropizm, transdukcja sygnałów indukowanych przez fitohormony, aklimatyzacja w warunkach stresu solnego, zimna i suszy oraz odpowiedź roślin na działanie patogenów [8]. W obrębie komórki roślinnej obserwuje się bardzo różną lokalizację kinaz zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$ . Enzymy te dodatkowo wykazują odmienne powinowactwo względem jonów wapniowych. Zarówno powinowactwo, jak i wewnątrzkomórkowa lokalizacja enzymu stanowią czynniki, które prawdopodobnie zaangażowane są w generowanie specyficznej odpowiedzi komórkowej [8,41].

Sensory przekaźnikowe (ang. *sensor relays*) przechodzą indukowaną przez  $\text{Ca}^{2+}$  konformacyjną przemianę transmitowaną następnie do współdziałającego partnera. Do tej grupy sensorów należy kalmodulina [43]. Jako główny sensor  $\text{Ca}^{2+}$ , kalmodulina uczestniczy w transdukcji sygnałów generowanych w odpowiedzi na różnorodne bodźce abiotyczne i biotyczne. Jednym z białek docelowych oddziałujących z CaM jest zależna od niej kinaza białkowa II, która pełni funkcje dekodera częstotliwości oscylacji  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  [27]. Inną rodzinę w obrębie wapniowych sensorów przekaźnikowych stanowią białka podobne do kalcyneuryny B - CBL (z ang. *calcineurin B like proteins*), które mogą być zaangażowane w dekodowanie sygnałów  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  indukowanych np. przez stres solny. Białka CBL oddziałują z grupą kinaz białkowych należących do rodziny CIPK (ang. *CBL-interacting protein kinases*), które dekodują informacje zapisane w formie oscylacji  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  [29].

Większość sensorów wapniowych wiąże jony  $\text{Ca}^{2+}$  przez wysoce konserwatywne motywy typu *EF-hand*, w których skład wchodzi 29 reszt aminokwasowych, tworzących strukturę helisa-pętla-helisa (HLH). Występujące w tych motywach aminokwasy uczestniczą w tworzeniu wiązań koordynacyjnych z jonami wapnia. Motywy *EF-hand* zawierają następujące rodziny sensorów  $\text{Ca}^{2+}$ : kalmoduliny, białka kalmodulino-podobne (ang. *CaM-like-poteins*), białka podobne do kalcyneuryny B i zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  kinazy białkowe (CDPK) [38].

W sensorach wapniowych zidentyfikowanych u roślin, pojawiają się także dwa inne motywy aminokwasowe, które pośredniczą w zależnym od  $\text{Ca}^{2+}$  oddziaływaniu białek z błonami lub lipidami błonowymi. Są to: 70-aminokwasowe sekwencje występujące w aneksynach [9] oraz zbudowane z 130–145 aminokwasów domeny typu C2, które tworzą szkielet o formie  $\beta$ -harmonijki, złożony z 8 antyrównoległych pasm połączonych przez pętle. Pętle 1–3 są umiejscowione na szczycie  $\beta$ -harmonijki i koordynują jony  $\text{Ca}^{2+}$  [44]. Związanie  $\text{Ca}^{2+}$  z domeną C2 ułatwia interakcję białka z ujemnie naładowanymi fosfolipidami [38].

Sensory wapniowe zaangażowane są w liczne procesy komórkowe [38]:

- ◆ dekodowanie sygnałów  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  i transdukcję informacji do elementów docelowych;
- ◆ kaskady fosforylacji i defosforylacji;
- ◆ transport błonowy;
- ◆ w sygnalizację, w której biorą udział produkty rozpadu różnych fosfolipidów błonowych,
- ◆ transkrypcję i translację;
- ◆ procesy rozwojowe (np. wzrost łagiewki pyłkowej).



Zaktywowane przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  sensory wapniowe wchodzą w interakcję z białkami docelowymi i zmieniają transportowe i enzymatyczne właściwości tych białek, wpływają na orientację cytoskieletu, kaskady fosforylacji białek oraz ekspresję genów [50]. Kształt odpowiedzi fizjologicznej determinowany jest nie tylko przez zmiany  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , ale także przez ekspresję sensorów wapniowych, ich powinowactwo względem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz białek docelowych, a także przez wewnątrzkomórkową lokalizację i aktywność białek docelowych [14].

#### 4. MODULOWANIE SYGNATURY WAPNIOWEJ

Cytozolowe sygnały wapniowe, indukowane na skutek stymulacji komórki, podlegają procesowi modulacji, co jest istotne w wytworzeniu najbardziej optymalnej dla komórki odpowiedzi fizjologicznej. Modulacja i kontrola sygnału  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  zachodzi np. na poziomie pewnych elementów sygnalizacyjnych, które są docelowe dla licznych kaskad  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  i mogą one przetwarzać lub blokować docierające do nich sygnały wapniowe [48]. Ekspozycja komórki na specyficzne czynniki lub zmiana dostępności komórkowych komponentów zaangażowanych w sygnalizację wapniową, modyfikuje również formę sygnału  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

Sygnatura  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , indukowana przez określony bodziec, może być kształtowana przez różne sygnały odebrane wcześniej przez tę samą komórkę [48]. W komórkach powszechne jest zjawisko dyskryminacji sygnałów  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  powstających na skutek powtarzalnej stymulacji lub w czasie refrakcji, gdy wzrost  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  nie może być wywołany przez ten sam czynnik środowiskowy lub rozwojowy. Wielkość zmian  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , indukowanych np. na skutek powtarzalnej stymulacji przez wiatr, staje się dużo mniejsza, zaś uzyskanie pełnej odpowiedzi fizjologicznej możliwe jest dopiero po okresie refrakcji trwającym kilka minut [26]. Obserwacje te mogą wynikać z desensytyzacji kaskady sygnalizacyjnej lub z opróżnienia magazynów uwalniających  $\text{Ca}^{2+}$  do cytozolu [50]. Sygnatury wapniowe, wywołane przez jeden czynnik środowiskowy, mogą być modyfikowane przez wcześniejszą ekspozycję roślin na czynniki o odmiennej w stosunku do niego naturze. Przykładowo, zakres zmian poziomu  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  w odpowiedzi na stres oksydacyjny jest redukowany na skutek wcześniejszej ekspozycji komórki na stres hiperosmotyczny [24]. Sugeruje to istnienie oddziaływań typu *cross-talk* pomiędzy kaskadami sygnalizacyjnymi lub kaskadami i magazynami wapniowymi wykorzystywanymi przez oba te czynniki. Oddziaływanie *cross-talk* pomiędzy odrębnymi szlakami sygnalizacyjnymi, odpowiadającymi na różne warunki środowiska, umożliwia optymalizację odpowiedzi komórki roślinnej na określone bodźce [50].

#### 5. PODSUMOWANIE

Od momentu rozpoczęcia badań nad mechanizmami transdukcji sygnałów w komórkach, wiedza o sygnalizacyjnej funkcji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dynamicznie powiększa się. Identyfikacja wtórnych przekaźników informacji, uczestniczących w mobilizacji wapnia

oraz scharakteryzowanie licznych efektorów wapniowych, regulowanych przez zmiany poziomu  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ , umożliwiło stopniowe zrozumienie sygnalizacyjnych mechanizmów funkcjonujących w komórce. W ostatnich latach wykazano, że stymulowane poprzez różne bodźce uwalnianie (mobilizacja) jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów do cytoplazmy umożliwia generowanie sygnałów  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  o zróżnicowanych charakterystykach czasowych i przestrzennych. Jednocześnie zaobserwowano, że określone wzorce sygnałów wapniowych stymulują odmienne efekторы komórkowe i tym samym warunkują powstawanie specyficznych odpowiedzi fizjologicznych [13].

Obecnie jony  $Ca^{2+}$  uważane są za jeden z kluczowych elementów biorących udział w mechanizmie dekodowania zewnętrznych sygnałów, docierających do komórki. Jony wapnia jako przekaźnik informacji odgrywają również istotną rolę w wielu ważnych procesach komórkowych (np. w zapłodnieniu, podczas proliferacji i różnicowania się komórek, a także podczas apoptozy)[39].

Wiedza na temat udziału jonów wapnia w regulacji procesów komórkowych systematycznie powiększa się. Mimo to wiele pytań związanych z tymi zagadnieniami ciągle pozostaje bez odpowiedzi. Dotyczą one między innymi:

- ◆ sposobu regulacji białek uczestniczących w utrzymywaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów  $Ca^{2+}$ ;

- ◆ biologicznego znaczenia sygnatury wapniowej i sposobu w jaki specyficzne czasowo-przestrzenne zmiany stężenia  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  kodują informacje konieczne do powstania specyficznej odpowiedzi komórkowej;

- ◆ elementów (białek) docelowych, podlegających regulacji przez wewnątrzkomórkowe sygnały wapniowe ( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ );

- ◆ interakcji typu *cross-talk* pomiędzy poszczególnymi szlakami transdukcji sygnału.

Zarówno pytania, jak i wątpliwości wyznaczają obecnie kierunki, którymi podążają dalsze badania nad rolą jonów wapnia w procesach sygnalizacji wewnątrz- i międzykomórkowej.

## LITERATURA

- [1] ALLEN GA, KWAK JM, CHU SP, LLOPIS J, TSIEN RY, HARPER JF, SCHROEDER JI. Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* 1999; **19**: 735–747.
- [2] ALLEN GJ, CHU SP, HARRINGTON CL, SCHUMACHER K, HOFFMANN T, TANG YY, GRILL E, SCHROEDER JI. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 2001; **411**: 1053–1057.
- [3] BERRIDGE MJ, LIPP P, BOOTMAN MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**: 11–21.
- [4] BIBIKOVA TN, ZHIGILEI A, GILROY S. Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta* 1997; **203**: 497–505.
- [5] BLATT MR.  $Ca^{2+}$  signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 196–204.
- [6] BLUME B, NURNBERGER T, NASS N, SCHEEL D. Receptor mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 2000; **12**: 1425–1440.
- [7] CESSNA SG, KIM J, TAYLOR ATS. Cytosolic  $Ca^{2+}$  pulses and protein kinase activation in the signal transduction pathways leading to the protein oxidative burst. *J Plant Biol* 2003; **46**: 215–222.



- [8] CHENG SH, WILLMANN MR, CHEN HC, SHEEN J. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* 2002; **129**: 469–485.
- [9] CLARK GB, ROUX SJ. Annexins of plant cell. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1133–1139.
- [10] EVANS DE, WILLIAMS LE. P-type calcium ATPases in higher plants – biochemical, molecular and functional properties. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1376**: 1–25.
- [11] EVANS NH, MCAINSH MR, HETHERINGTON AM. Calcium oscillations in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 415–420.
- [12] FELLE H. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 1988; **174**: 495–499.
- [13] GALIONE A, CHURCHILL GC. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* 2002; **32**: 343–354.
- [14] GILROY S, TREWAVAS A. Signal processing and transduction in plant cells: the end of beginning? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 307–314.
- [15] GODDARD H, MANISON NFH, TOMOS D, BROWNLEE C. Elemental propagation of calcium signals in response-specific patterns determined by environmental stimulus strength. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 1932–1937.
- [16] GRABOV A, BLATT MR. Membrane voltage initiates  $Ca^{2+}$  waves and potentiates  $Ca^{2+}$  increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4778–4783.
- [17] HARMON AC, GRIBSKOV M, HARPER JF. CDPKs – a kinase for every  $Ca^{2+}$  signal? *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 154–159.
- [18] HARPER JF, BRETON G, HARMON A. Decoding  $Ca^{2+}$  signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 263–268.
- [19] HEPLER PK. Tip growth in pollen tubes: calcium leads the way. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 79–80.
- [20] HETHERINGTON AM, BROWNLEE C. The generation of  $Ca^{2+}$  signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 401–427.
- [21] HIRSCHI K. Vacuolar  $H^{+}/Ca^{2+}$  transport: who's directing the traffic? *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 100–104.
- [22] KIEGLE E, MOORE CA, HASELOFF J, TESTER MA, KNIGHT MR. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J* 2000; **23**: 267–278.
- [23] KNIGHT H, TREWAVAS AJ, KNIGHT MR. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 1997; **12**: 1067–1078.
- [24] KNIGHT H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 2000; **195**: 269–324.
- [25] KNIGHT MR, CAMPBELL AK, SMITH SM, TREWAVAS AJ. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 1991; **352**: 524–526.
- [26] KNIGHT MR, SMITH SM, TREWAVAS AJ. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4967–4971.
- [27] KONINCK P, SCHULMAN H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of  $Ca^{2+}$  oscillations. *Science* 1998; **279**: 227–230.
- [28] LECOURIEUX D, MAZARS C, PAULY N, RANJEVA R, PUGIN A. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 2002; **14**: 2627–2641.
- [29] LUAN S, KUDLA J, RODRIGUEZ M, YALOWSKY S, GRUISSEM W. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 2002; **14**: S389–S400.
- [30] MALHOR, MOUTINHO A, VANDER LUIT A, TREWAVAS AJ. Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit plant cell calcium in signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; **353**: 1463–1473.
- [31] MCAINSH MR. Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol Plant* 1997; **100**: 16–20.
- [32] MUIR SR, SANDERS D. Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol* 1997; **114**: 1511–1521.
- [33] NAVAIZO L, BEWELL MA, SIDDIQUA A, DICKINSON GD, GALIONE A, SANDERS D. Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8693–8698.
- [34] NAVAIZO L, MARIANI P, SANDERS D. Mobilization of  $Ca^{2+}$  by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiol* 2001; **125**: 2129–2138.
- [35] NG CKY, MCAINSH MR. Encoding specificity in plant calcium signalling: hot-spotting the ups and downs and waves. *Ann Bot* 2003; **92**: 477–485.

- [36] PITTMAN JK, SREEVIDYA CS, SHIGAKI T, UEOKA-NAKANISHI H, HIRSCHI KD. Distinct N-terminal regulatory domains of  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporters. *Plant Physiol* 2002; **130**: 1054–1062.
- [37] REDDY ASN. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci* 2001; **160**: 381–404.
- [38] REDDY VS, REDDY ASN. Proteomics of calcium-signaling components in plant. *Phytochemistry* 2004; **12**: 1745–1776.
- [39] RIZZUTO R, POZZAN T, CARAFOLI E.  $\text{Ca}^{2+}$  on the move: ways and means to translate a multivariuous signal. *Trends Pharmacol Sci* 2002; **8**: 348–350.
- [40] RUDD JJ, FRANKLIN-TONG VE. Unraveling response-specificity in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathways in plant cells. *New Phytol* 2001; **151**: 7–33.
- [41] SANDERS D, PELLOUX J, BROWNLEE C, HARPER JF. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 2002; **14**: S401–S417.
- [42] SCRASE-FIELD SA, KNIGHT MR. Calcium: just a chemical switch? *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 500–506.
- [43] SNEDDEN WA, FROMM H. Calmodulin as versatile signal transducer in plants. *New Phytol* 2001; **151**: 35–66.
- [44] SUTTON RB, DAVLETOV BA, BERGHUIS AM, SUDHOF TC, SPRANG SR. Structure of the first C2 domain of synaptogamin I: a novel  $\text{Ca}^{2+}$ /phospholipid-binding fold. *Cell* 1995; **80**: 929–938.
- [45] SZE H, LIANG F, HWANG I, CURRAN AC, HARPER JF. Diversity and regulation of plant  $\text{Ca}^{2+}$  pumps: insight from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 433–462.
- [46] TAYLOR AR, MANISON NFH, FERNANDEZ C, WOOD JW, BROWNLEE C. Spatial organization of calcium signalling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *Plant Cell* 1996; **8**: 1935–1949.
- [47] TRETYN A. Wapń w komórkach eukariotycznych. Występowanie, transport, komórkowy mechanizm działania. Warszawa, PWN, 1994.
- [48] TREWAVAS A. Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiol* 1999; **120**: 1–6.
- [49] WHITE PJ. Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1465**: 171–183.
- [50] WHITE PJ, BROADLEY MR. Calcium in plants. *Ann Bot* 2003; **92**: 487–511.
- [51] YANG HM, ZHANG XY, WANG GX. Cytosolic calcium oscillation signaling in guard cell. *Plant Sci* 2004; **166**: 549–556.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 16.11.2004 r.  
Przyjęto: 09.05.2005 r.  
Gagarina 9, 87-100 Toruń,  
E-mail: tran@biol.uni.torun.pl



## ROLA APOPTOZY W ODPOWIEDZI NA PRZESZCZEP ALLOGENICZNY: TOLERANCJA I ODRZUCANIE PRZESZCZEPU\*

THE ROLE OF APOPTOSIS IN RESPONSIVENESS TO ALLOGRAFT:  
TOLERANCE AND GRAFT REJECTION

<sup>1</sup>Anna KORECKA, <sup>1,2</sup>Grażyna KORCZAK-KOWALSKA

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

<sup>2</sup>Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Transplantologii,  
Akademia Medyczna w Warszawie

*Streszczenie:* Badania ostatnich kilku lat dowodzą, że apoptoza odgrywa istotną rolę nie tylko w odrzucaniu przeszczepu, ale także w indukcji tolerancji transplantacyjnej. Apoptoza – programowana śmierć komórek jest aktywnym procesem dotyczącym zbędnych bądź nieprawidłowych komórek. W odpowiedzi na przeszczep allogeniczny szczególnie znaczenie mają dwa mechanizmy: AICD – śmierć komórek indukowana aktywacją, związana z połączeniem Fas/FasL oraz PCD – pasywna śmierć komórek powodowana niedoborem cytokin. Odrzucanie przeszczepu zachodzi ze względu na różnice genetyczne pomiędzy dawcą a biorcą. W niszczeniu przeszczepu uczestniczą komórki efektorowe, w tym alloreaktywne limfocyty CD8. Wykazują one ekspresję FasL, indukując w ten sposób apoptozę Fas-pozytywnych komórek przeszczepu. Udział obwodowej delecji w indukcji tolerancji transplantacyjnej zależy od ilości alloreaktywnych limfocytów – apoptoza jest potrzebna do obniżenia ich poziomu do takiego, który może być pod kontrolą mechanizmów regulacyjnych (model *pool size*). Apoptoza ułatwia również rozwój stanu immunoregulacyjnego poprzez działanie antyzapalne i związaną z tym supresję immunostymulacyjnych zdolności APC. Terapeutyczne strategie indukcji tolerancji przeszczepu poprzez delecję alloreaktywnych limfocytów obejmują: makrochimeryzm, modyfikacje ekspresji FasL, blokadę kostymulacji oraz przeciwciała anty-CD28 stosowane w obecności IFN- $\gamma$ . Wiele leków immunosupresyjnych hamując aktywację limfocytów prawdopodobnie uniemożliwia zajście apoptozy (np. CsA i FK506), ale są również takie, których działanie opiera się przypuszczalnie na indukcji apoptozy (np. RAPA i MMF). Apoptoza alloreaktywnych limfocytów wydaje się być niezbędna dla uzyskania tolerancji przeszczepu. Nie tylko bezpośrednio obniża liczbę komórek atakujących przeszczep, ale również ułatwia wytworzenie stanu immunoregulacyjnego.

*Słowa kluczowe:* apoptoza, tolerancja transplantacyjna, odrzucanie przeszczepu, delecja, limfocyty T.

\*Praca dofinansowana z projektu KBN nr 3 PO5B 074 25.

*Summary:* Studies of a few last years give evidence for a role of apoptosis not only in graft rejection but also in induction of transplantation tolerance. Apoptosis – programmed cell death is an active process which refers to superfluous and defective cells. For a responsiveness to allograft the most important are two mechanisms of apoptosis: AICD (activation induced cell death) which involves Fas/FasL engagement and PCD (passive cell death) – caused by cytokine withdrawal. Graft rejection is caused by genetic differences between a donor and a recipient. Allograft is damaged by effector cells including alloreactive lymphocytes T CD8+. These cells express FasL and could thereby induce apoptosis in Fas-positive graft cells. Participation of peripheral apoptosis in induction of transplantation tolerance depends on pool size of alloreactive lymphocytes – apoptosis is necessary to reduce the size of alloreactive T cells clone to be small enough to be controlled by immunoregulatory mechanism (“pool size” model). Apoptosis facilitates also the development of immunoregulation by antiinflammatory action and thereby suppression of immunostimulatory abilities of APC. Therapeutic strategies of the induction of transplantation tolerance by alloreactive lymphocyte deletion include macrochimerism, modification of FasL expression, costimulatory blockade, and anti-CD28 antibodies in the presence of IFN- $\gamma$ . Most of immunosuppressive drugs like CsA and FK506 possibly inhibit apoptosis by inhibition of T cell activation. It is quite likely that there are also regimens that induction of apoptosis contributes to their immunosuppressive activity, e.g. RAPA and MMF. Apoptosis of alloreactive lymphocyte T seems to be necessary to achieve transplantation tolerance. Not only does it reduce directly the quantity of cells attacking graft but it also facilitates the development of immunoregulation state.

*Keywords:* apoptosis, transplantation tolerance, graft rejection, deletion, T lymphocytes.

*Wykaz stosowanych skrótów:* AICD – śmierć komórek indukowana aktywacją; APC – komórka prezentująca antygen; CsA – cyklosporyna; DC – komórka dendrytyczna; FK506 – takrolimus; IFN – interferon; IL – interleukina; MHC – główny układ zgodności tkankowej; MMF – mykofenolan mofetilu; PCD – pasywna śmierć komórek; RAPA – rapamycyna; TCR – receptor limfocyty T; TGF – transformujący czynnik wzrostu; Th – limfocyt T pomocniczy; TNF – czynnik martwicy nowotworu.

## WPROWADZENIE

Apoptoza – programowana śmierć komórek, odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju limfocytów, odpowiedzi przeciw antygenom i zachowaniu homeostazy immunologicznej. Udział apoptozy w odrzucaniu przeszczepu nie wzbudza wątpliwości. Natomiast rola w tolerancji przeszczepu to zagadnienie, którym badacze zajmują się dopiero od kilku lat. Do niedawna uważano, że za uzyskanie tolerancji odpowiedzialne są głównie mechanizmy immunoregulacyjne. Obecnie coraz większe znaczenie przypisuje się apoptozie limfocytów T, szczególnie w fazie indukcji tolerancji.

Apoptoza – jest aktywnym, zależnym od sygnałów procesem dotyczącym nadmiernych liczebnie, bezużytecznych i nieprawidłowych komórek. W odpowiedzi na przeszczep allogeniczny szczególne znaczenie mają dwa typy apoptozy: śmierć komórek indukowana aktywacją (AICD – *activation induced cell death*) i śmierć przez zaniedbanie, tzw. pasywna śmierć komórek (PCD – *passive cell death*).

AICD wyzwalana jest w komórce przez połączenie cząsteczki Fas(CD95) znajdującej się na jej powierzchni z FasL(CD95L) tej samej lub innej komórki [21]. Stymulacja CD3/TCR wcześniej aktywowanego limfocyty indukuje ekspresję FasL na komórce, połączenie FasL z Fas prowadzi do apoptozy. W limfocytach CD4+ AICD jest indukowana przez ścieżkę Fas/FasL, w komórkach CD8+ także przez inne receptory z rodziny TNF-R [11,13,17,18]. Wykazano, że apoptoza antygenowo-specyficznych CD4+ i CD8+ jest indukowana przez IFN- $\gamma$  [14]. Do zajścia AICD niezbędna



jest IL-2 - preekspozycja na IL-2 zwiększa wrażliwość na apoptozę, ale późniejsza ekspozycja na IL-2, w czasie reaktywacji TCR, zapobiega apoptozie [9,11,13].

PCD wiąże się z tym, że w czasie aktywacji poprzez stymulację TCR, limfocyt nabiera zdolności do odpowiedzi na czynniki wzrostu, m.in. IL-2, które umożliwiają ekspresję antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-xL. Jeśli aktywowane limfocyty zostaną pozbawione czynników wzrostu, podlegają apoptozie (śmierć przez zaniedbanie). PCD jest regulowane przez dodatkowe receptory. Kostymulacja, czyli zwiążanie B7.1 (CD80) lub B7.2 (CD86) znajdującego się na powierzchni komórki dendrytycznej przez receptor CD28 limfocytu indukuje ekspresję kilku cytokin, m.in. IL-2. Tym samym wzmacnia ekspresję Bcl-xL, Bcl-2 chroniąc przed apoptozą przez zaniedbanie (PCD).

Zarówno pasywna, jak i aktywna ścieżka apoptozy wymagają aktywacji limfocytów.

## ROLA APOPTOZY W ODRZUCANIU PRZESZCZEPU

Udział apoptozy w odrzucaniu przeszczepu potwierdzają m.in. biopsje przeszczepów nerki i innych narządów u ludzi, gdzie w czasie epizodów odrzucania są wykrywane komórki przeszczepu w apoptozie.

Limfocyty CD8<sup>+</sup> mogą zabijać komórki docelowe przez trzy mechanizmy: Ca<sup>++</sup>-zależny system perforyny/granzymy, uwalnianie cytotoksycznych cytokin, np. TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  oraz poprzez interakcje Fas/FasL. Ścieżka perforyny/granzymy nie odgrywa podstawowej roli w efektorowej fazie odrzucania przeszczepu. Natomiast w wielu modelach wykazano, że obniżenie ekspresji FasL i TNF- $\alpha$  wiąże się ze spadkiem apoptozy komórek przeszczepu, natomiast wzrost ekspresji FasL i TNF- $\alpha$  z ostrym odrzucaniem przeszczepu serca u szczurów [12].

Proponowany mechanizm odrzucania przeszczepionej tkanki zakłada, że FasL na powierzchni limfocytów uczestniczących w odpowiedzi przeciwko przeszczepowi (a więc na komórkach naciekających przeszczep) zabija mające receptor Fas komórki przeszczepu indukując w nich apoptozę [13]. Dodatkowo FasL może działać na makrofagi inicjując zapalne niszczenie tkanek (główną bronią w cytotoksyczności makrofagów jest TNF- $\alpha$ ) [12].

Jednakże są też prace sugerujące, że brak interakcji Fas/FasL nie zmienia tempa odrzucania przeszczepu, a ścieżka Fas/FasL nie jest niezbędna w indukowanym przez limfocyty T niszczeniu przeszczepu. Być może w grę wchodzi inne receptory z rodziny TNF-R. Natomiast FasL może pełnić rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej [12].

## TOLERANCJA PRZESZCZEPU

### Mechanizmy tolerancji immunologicznej

Tolerancję można zdefiniować jako stan, w którym układ odpornościowy nie rozwija odpowiedzi przeciwko specyficznemu antygenowi (bądź antygenom), nie ma potrzeby stosowania egzogennej immunosupresji, a odpowiedź przeciwko pozostałym antygenom jest utrzymana [19].

Mechanizmy proponowane jako podstawa tolerancji transplantacyjnej można podzielić na dwie kategorie: mechanizmy związane z delecją alloreaktywnych limfocytów oraz pozostałe mechanizmy immunoregulacyjne, które obejmują:

- aktywną regulację przez komórki regulatorowe (supresorowe) odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom dawcy,
- anergię – stan braku odpowiedzi na alloantygen,
- immunologiczny dymorfizm przez zmianę mikrośrodowiska cytokin u biorcy, szczególnie w samym przeszczepie (Th1→Th2)

### Delecja potrzebna w indukcji tolerancji

Delecja alloreaktywnych limfocytów może zachodzić w dwóch oddzielnych anatomicznie i funkcjonalnie obszarach: w grasicy (centralnie) i na obwodzie.

Znaczenie centralnej delecji wykazał Medawar w 1953 r. w swoim pionierskim eksperymencie, gdzie udowodnił, że poprzez klonalną delecję alloreaktywnych limfocytów spowodowaną neonatalną ekspozycją na alloantygeny, można uzyskać trwałą tolerancję na przeszczep skóry (noworodki gryzoni w przeciwieństwie do ludzkich rodzą się, zanim większość dojrzałych limfocytów T wydobędzie się z grasicy).

Na udział delecji obwodowej w indukcji tolerancji wskazują m.in. następujące obserwacje: jądra i rogówka oka są immunologicznie uprzywilejowane, tzn. są chronione przed zniszczeniem przez limfocyty w czasie infekcji i co więcej nie są odrzucane po transplantacji do biorców niezgodnych w zakresie MHC. Jak wykazano, wiąże się to m.in. z indukcją apoptozy alloreaktywnych limfocytów biorcy przeszczepu [7]. Także przeszczep wątroby jest spontanicznie akceptowany, tu również wykazano związek z masową apoptozą alloreaktywnych limfocytów [22,23,26].

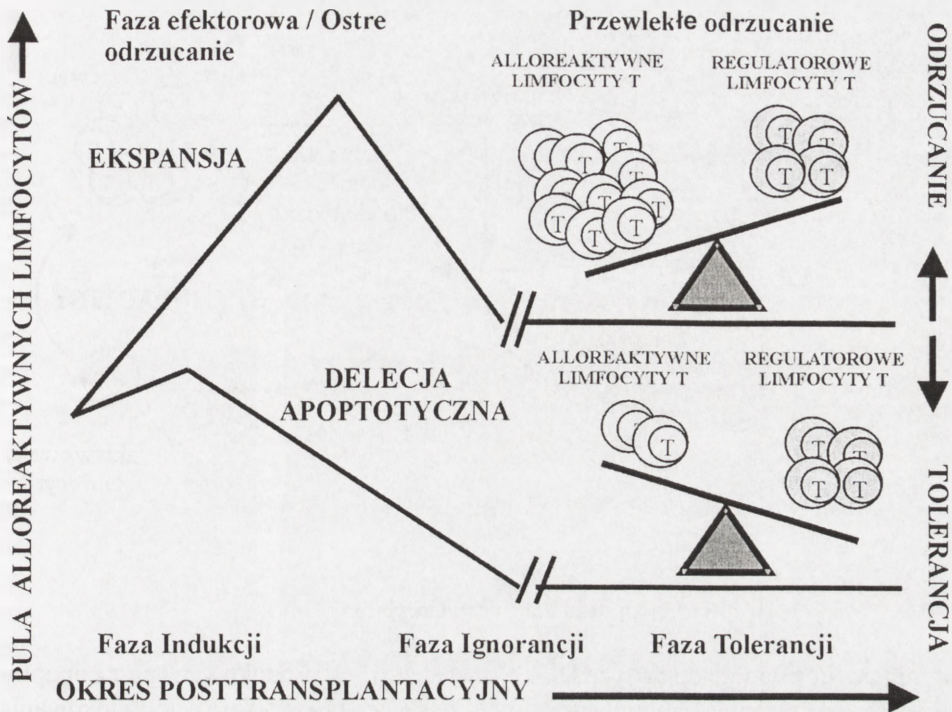
Rolę obwodowej apoptozy limfocytów T w indukcji tolerancji przeszczepu potwierdzają badania na transgenicznym myszom Bcl-xL i IL-2KO. Myszy Bcl-xL wykazują konstytutywną nadekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-xL, co czyni je opornymi na śmierć komórek powodowaną niedostatkami cytokin (PCD). Myszy IL-2KO, tj. z nokautem genu kodującego IL-2, są odporne na śmierć komórek indukowaną aktywacją (AICD), ale nie mają zaburzonej zdolności do aktywacji limfocytów T [19].

### Model „pool size”

Wells i in. [18,29,31,32] proponują model, w którym liczba alloreaktywnych limfocytów (*pool size*) determinuje udział obwodowej delecji w indukcji tolerancji transplantacyjnej. Według tej hipotezy szczególnie wysoki poziom dziewiczych limfocytów T zdolnych do bezpośredniego rozpoznania allogenicznych antygenów MHC (tj. 1 na 10 limfocytów dziewiczych) zwiększa znaczenie apoptozy w uzyskaniu tolerancji. Apoptoza obniża poziom alloreaktywnych limfocytów do takiego, z którym „poradzą sobie” komórki regulatorowe, anergia i immunologiczny dymorfizm (ryc. 1).

Obwodowa delecja może być mniej istotna w indukcji tolerancji na antygeny, przeciwko którym skierowana jest stosunkowo mała populacja reaktywnych limfocytów. Tezę tę potwierdza zdolność immunologicznego dymorfizmu do samodzielnej indukcji przedłużenia przeżycia przeszczepu niezgodnego pod względem „słabych” antygenów zgodności tkankowej (*minor-mismatched*).





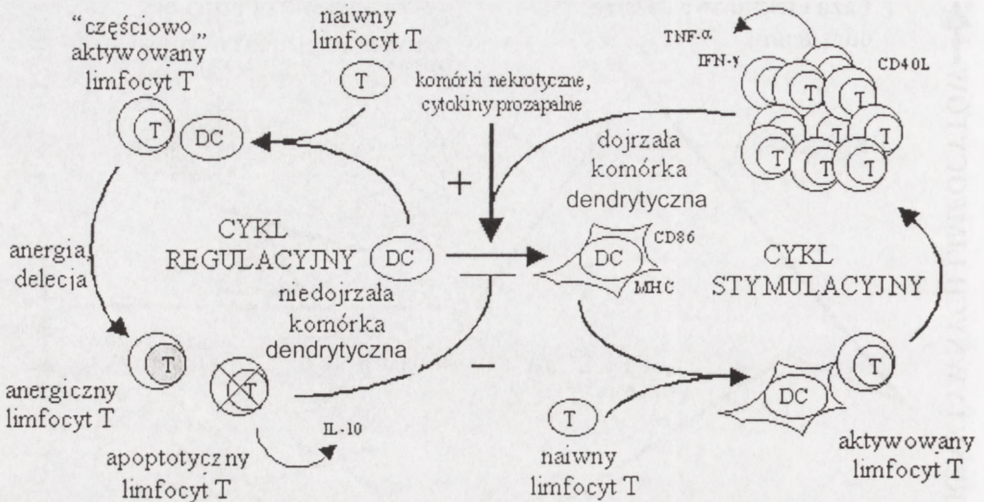
RYCINA 1. Zależności między delecją a immunoregulacją.

Obwodowa delecja wydaje się niezbędną dla przedłużenia życia przeszczepu niezgodnego w zakresie MHC, ale nie jest wystarczająca dla utrzymania długoterminowej tolerancji na antygeny dawcy. Prawdopodobnie podstawą długoterminowej transplantacyjnej tolerancji jest aktywny stan immunoregulacyjny [8]. Ostatnie badania sugerują jednak, że obwodowa delecja może ułatwiać rozwój aktywnej supresji, w tym rozwój komórek regulatorowych we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej na antygeny allogeniczne.

### Rola obwodowej apoptozy w indukcji tolerancji

Apoptoza odgrywa rolę w indukcji obwodowej tolerancji nie tylko bezpośrednio, poprzez zmniejszenie puli alloreaktywnych limfocytów. Apoptoza prawdopodobnie ułatwia rozwój regulatorowych limfocytów T dzięki swojemu działaniu przeciwzapalnemu i związanej z tym supresją immunostymulacyjnych zdolności APC (ryc. 2).

W czasie odpowiedzi zapalnej, krążące niedojrzałe komórki dendrytyczne (DC) przetwarzając antygeny pochodzące z nekrotycznych komórek nabierają zdolności do stymulowania aktywności limfocytów T (dojrzewają do APC). Z kolei aktywowane limfocyty dostarczają sygnałów do dojrzewania DC. Komórki apoptotyczne nie wytwarzają cytokin prozapalnych i pochłonięcie ich antygenów nie indukuje dojrzewania DC. Dziewicze limfocyty T po napotkaniu niedojrzałych DC niosących antygeny ulegają klonalnej delecji bądź anergii (prawdopodobnie wskutek niskiego poziomu ekspresji



RYCINA 2. Apoptoza ułatwia rozwój stanu immunoregulacyjnego

kostymulacyjnych molekuł na tych DC). Co więcej, IL-10 produkowana przez apoptotyczne komórki tuż przed śmiercią powoduje, że DC zyskują zdolność do indukowania tolerancji na alloantygeny u żywych alloreaktywnych limfocytów T (immunologiczny dymorfizm). Także fagocytoza apoptotycznych komórek przez makrofagi powoduje produkcję przeciwzapalnych cytokin IL-10 i TGF- $\beta$  [6,12,18].

## Mechanizmy wywoływania apoptozy limfocytów

### Indukcja apoptozy centralnej

Terapeutyczne strategie dla indukcji tolerancji na alloantygeny dawcy przez centralną delecję alloreaktywnych limfocytów zawierają mieszany chimeryzm i wewnątrzgrasiczą iniekcję antygenów dawcy. Jeśli centralna delecja alloreaktywnych limfocytów ma być jedynym mechanizmem utrzymania tolerancji, antygeny dawcy muszą pozostawać w grasicy w czasie posttransplantacyjnym. W mieszanych allogenicznym chimerach u myszy, pochodzące od dawcy komórki dendrytyczne (transplantacja hematopoetycznych komórek macierzystych dawcy) po zasiedleniu grasicy są w niej stale obecne. Kontynuowana jest delecja tymocytów aktywowanych antygenami dawcy i osiągana tolerancja przeszczepu. Aby ta strategia była efektywna, potrzebny jest wysoki poziom stabilnego chimeryzmu, tzw. makrochimeryzm [30,33]. Także iniekcja antygenów dawcy bezpośrednio do grasicy młodych szczurów, powoduje delecję alloreaktywnych limfocytów, z tym że trwającą dopóki wstrzyknięte antygeny pozostają w grasicy [33].

Niestety tworzenie mieszanego chimeryzmu u ludzi jest problematyczne. Brakuje mało inwazyjnych środków pozwalających na eliminację limfocytów T do poziomu wystarczającego na wszczepienie komórek macierzystych niezgodnych w zakresie MHC.



## Indukcja apoptozy obwodowej

**Interakcja Fas/FasL.** W badaniach nad rolą obwodowej apoptozy limfocytów T w indukcji tolerancji największe zainteresowanie wzbudza ścieżka zależna od cząsteczki Fas. Wiąże się to ze świadomością, że tkanki immunologicznie uprzywilejowane poprzez konstytutywną ekspresję FasL powodują delecję Fas-pozytywnych limfocytów T [6,7,8,21,35].

*In vitro* wysoka ekspresja FasL na komórkach docelowych, może ochronić je przed zniszczeniem przez limfocyty T – powoduje apoptozę limfocytów [4]. *In vivo* natomiast ujawniają się prozapalne i chemotaktyczne względem neutrofilii właściwości cząsteczki FasL. Wysoka ekspresja FasL nie gwarantuje akceptacji przeszczepu: przeszczep trzustki z wysoką ekspresją FasL (genetyczne modyfikacje) jest niszczone przez neutrofile [4].

Ostatnio udowodniono, że zmodyfikowane białko SA-FasL (z usuniętym fragmentem odpowiedzialnym za właściwości metaloproteiny i sprzężone ze streptawidyną) przestaje być chemotaktyczne dla neutrofilii. Umieszczenie takiego chimerycznego białka na komórkach endotelialnych naczyń krwionośnych serca pozwala na przeżycie przeszczepu przez około 9 dni [1]. Komplikacje związane z wykorzystaniem FasL występującego na komórkach przeszczepu można też w pewnym stopniu ominąć poprzedzając przeszczepienie leczeniem przy pomocy dawco-specyficznych DC genetycznie zmienionych w celu zwiększenia ekspresji FasL [24].

Interakcje Fas/FasL odgrywają minimalną rolę w zapobieganiu odrzuceniu przeszczepu poza miejscami immunologicznie uprzywilejowanymi, co może wynikać z tego, że indukcja antygenowo-specyficznej tolerancji w miejscach uprzywilejowanych jest często związana z wysokim poziomem cytokin immunoregulacyjnych, takich jak TGF- $\beta$  [17] i IL-10 [8]. Jak wykazano napływ granulocytów spowodowany wysoką ekspresją FasL, może być zablokowany przez TGF- $\beta$  [35]. Apoptoza alloreaktywnych limfocytów po przeszczepie rogówki spowodowana przez interakcje Fas/FasL związana jest z wytwarzaniem IL-10 przez umiarkujące komórki, co powoduje przejście Th1  $\rightarrow$  Th2 [8].

**Blokada kostymulacji.** PCD odgrywa ważną rolę w indukcji tolerancji transplantacyjnej powodowanej przez blokadę kostymulacji. Blokada sygnałów kostymulacyjnych dla limfocytów T – strategia używana z powodzeniem do indukcji tolerancji w eksperymentalnych modelach transplantacyjnych – powoduje defekt w ekspresji Bcl-xL i IL-2, przez to promuje PCD [36]. Wprowadzenie antygenów dawcy w obecności środków, które hamują funkcje kostymulacyjnych molekuł, powoduje delecję obwodowych alloreaktywnych limfocytów T [19].

**IFN- $\gamma$  i przeciwciała anti-CD28.** IFN- $\gamma$  jest niezbędny do delecji alloreaktywnych limfocytów w czasie indukcji tolerancji za pomocą przeciwciał anti-CD28. Interesujące jest również, że indukcja tolerancji przez blokadę kostymulacji także zależy od IFN- $\gamma$ . Mechanizm powodowania apoptozy przez ten czynnik jest nieznan. Niektóre źródła sugerują, że jest związany z Fas-zależną apoptozą, inne, że jest niezależny od receptorów śmierci [34].

### Wybrane środki immunosupresyjne a indukcja apoptozy

Leki immunosupresyjne hamują odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko alloantygenom przeszczepu. Część z nich hamując aktywację komórek, uniemożliwia tym samym zajście apoptozy. Jednakże równocześnie sugeruje się powiązanie wywieranego przez leki efektu antyproliferacyjnego ze zdolnością indukcji apoptozy.

Większość prac donosi, że cyklosporyna (CsA) i takrolimus (FK506) hamują apoptozę [3,8,25,30]. CsA i FK506 blokują sygnał TCR wymagany do zajścia AICD, a także transkrypcję IL-2 i FasL [25]. Blokują aktywację limfocytów, zanim ich przeżycie stanie się zależne od czynników wzrostu, czyniąc tym samym te komórki niewrażliwymi na PCD [20]. CsA i FK506 prawdopodobnie hamując sygnał aktywacji uniemożliwiają uzyskanie tolerancji przeszczepu, do której indukcji niezbędna jest apoptoza i aktywacja limfocytów T. Wysokie dawki CsA i FK506 podane w czasie rozpoznania alloantygenów i przy braku kostymulacji hamują przeżycie przeszczepu.

RAPA indukuje w komórkach PCD. Czyni to interferując z zależną od sygnału kostymulacyjnego (CD28) transkrypcją IL-2 w limfocytach T [27]. Ponadto hamuje ekspresję białek antyapoptotycznych [5,20,27] i wzmacnia apoptozę indukowaną przez blokadę kostymulacji [5,20]. Prawdopodobnie indukuje także AICD, choć tutaj zdania są podzielone [15,20,25,27]. Mykofenolan mofetilu (MMF) indukuje apoptozę limfocytów stymulowanych superantygenu SEB [10] oraz podwyższa ekspresję FasL [25]. Badania wskazują, że RAPA i MMF wydają się pomagać w uzyskaniu tolerancji przeszczepu, możliwe że przez promowanie apoptozy [3,19,20].

## PODSUMOWANIE

Przez długi czas apoptoza była utożsamiana z odrzucaniem przeszczepu – śmiercią komórek przeszczepionego narządu wyzwalaną przez alloreaktywne limfocyty T. Ostatnie dane podkreślają jednak również udział apoptozy w indukcji tolerancji przeszczepu. Apoptoza alloreaktywnych limfocytów T jest niezbędna nie tylko dla bezpośredniego obniżenia ich liczby, ale także ułatwia wytworzenie stanu immunoregulacyjnego. Mechanizmy tego procesu nie są jeszcze dostatecznie wyjaśnione i wymagają dodatkowych badań.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] ASKENASY N, YOLCU ES, WANG Z, SHIRVAN H. Display of Fas Ligand protein on cardiac vasculature as a novel means of regulating allograft rejection. *Circulation* 2003; **107**: r41–r47.
- [2] BISHOP GA, WANG C, SHARLAND AF, MCCAUGHAN GW. Spontaneous acceptance of liver transplants in rodents: evidence that liver leucocytes induce recipient T-cell death by neglect. *Immunol Cell Biol* 2002; **80**: 93–100.
- [3] CHIFFOLEAU E, WALSH PT, TURKA L. Apoptosis and transplantation tolerance. *Immunol Revs* 2003; **193**: 124–145.



- [4] DULAT HJ, GRUMBKOW VON C, BAARS W, SCHRODER N, WONIGEIT K, SCHWINZER R. Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 2217–2226.
- [5] FELLSTROM B, ZEJINA L. Apoptosis: friend or foe? *Transplant Proc* 2001; **33**: 2414–2416.
- [6] FERGUSON TA, GREEN D. T cells are just dying to accept grafts. *Nat Med* 1999; **5**(11): 1231–1232.
- [7] FERGUSON TA, GREEN DR, GRIFFITH TS. Cell death and immune privilege. *Intern Rev Immunol* 2002; **21**: 153–172.
- [8] FERGUSON TA, STUART PM, HERNDON JM, GRIFFITH TS. Apoptosis, tolerance, and regulatory T cells – old wine, new wineskins. *Immunol Rev* 2003; **193**: 111–123.
- [9] GUDMUNDSDOTTIR H, TURKA LA. T cell costimulatory blockade: new therapies for transplant rejection. *J Amer Soc Nephrol* 1999; **10**: 1356–1365.
- [10] IZERADJENE K, REVILLARD JP. Apoptosis of superantigen-activated T cells induced by mycophenolate mofetil treatment. *Transplantation* 2001; **71**: 118–125.
- [11] JANSSEN O, SANSENBACHER R, KABELITZ D. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* 2000; **301**: 85–99.
- [12] JOSIEN R, MUSCHEN M, GILBERT E, DOUILLARD P, HESLAN JM, SOULILLOU JP, CUTURI MC. Fas ligand, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 1998; **66**: 887–893.
- [13] KABELITZ D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation* 1998; **65**(7): 869–875.
- [14] KISHIMOTO K, SANDNER S, IMITOLA J, SHO M, LI Y, LANGMUIR PB, ROTHSTEIN DM, STROM TB, TURKA LA, SAYEGH MH. Th1 cytokines, programmed cell death, and alloreactive T cell clone size in transplant tolerance. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1471–1479.
- [15] KOENEN HJP, MICHIELSEN ECHJ, VERSTAPPEN J, FASSE E, JOOSTEN I. Superior T cell suppression by rapamycin and FK506 over rapamycin and cyclosporine A because of abrogated cytotoxic T-lymphocyte induction, impaired memory responses and persistent apoptosis. *Transplantation* 2003; **75**: 1581–1590.
- [16] LECHLER RI, GARDEN OA, TURKA LA. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 147–158.
- [17] LI XC, LI Y, DODGE I, WELLS AD, ZHENG XX, TURKA LA, STROM TB. Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1999; **163**: 2500–2507.
- [18] LI XC, STROM TB, TURKA LA, WELLS AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* 2001; **14**: 407–416.
- [19] LI XC, WELLS AD, STROM TB, TURKA LA. The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 522–527.
- [20] LI Y, LI XC, ZHENG XX, WELLS AD, TURKA LA, STROM TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; **5**(11): 1298–1302.
- [21] MAHER S, TOOMEY D, CONDRON C, BOUCHIER-HAYES D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 2002; **80**: 131–132.
- [22] MEYER D, THORWARTH M, OTTO C, GASSEL HJ, TIMMERMANN W, ULRICHS K, THIEDE A. Apoptosis of alloreactive T cells in liver allografts during tolerance induction. *Transplant Proc* 1999; **31**: 474.
- [23] MEYER D, THORWARTH W, OTTO C, GASSEL M, GASSEL H, TIMMERMANN W, ULRICHS K, THIEDE A. Early T-cell inactivation and apoptosis – critical events for tolerance induction after allogeneic liver transplantation. *Transplant Proc* 2001; **33**: 256–258.
- [24] MIN W, HUANG X, GORCZYŃSKI R, CATTRAL M. Fas ligand transfected dendritic cells induce apoptosis of antigen specific T cells. *Transplant Proc* 2001; **33**: 234.
- [25] NAKAMURA M, OGAWA N, SHALABI A, MALEY WR, LONGO D, BURDICK JF. Positive effect on T-cell regulatory apoptosis by mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 2001; **15** (Suppl 6): 36–40.
- [26] PARK S, MURRAY D, JOHN B, CRISPE N. Biology and significance of T-cell apoptosis in the liver. *Immunol Cell Biol* 2002; **80**: 74–83.
- [27] SEHGAL SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; **31**: 335–340

- [28] STEINMAN RM, TURLEY S, MRLLMAN I, INABA K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptosis cells. *J Exp Med* 2000; **191**: 411–416.
- [29] SUCHIN EJ, LANGMUIR PB, PALMER E, SAYEGH MH, WELLS AD, TURKA LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells *in vivo*: new answer to an old question. *J Immunol* 2001; **161**: 973–981.
- [30] SYKES M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* 2001; **14**: 417–424.
- [31] WELLS AD, LI XC, LI Y, WALSH MC, ZHENG XX, WU Z, NUNEZ G, TANG A, SAYEGH M, HANCOCK WW, STROM TB, TURKA LA. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med*. 1999; **5**: 1303–1307.
- [32] WELLS AD, LI XC, STROM TB, TURKA LA. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos T Roy Soc Lond B: Biol Sci* 2001; **356**: 617–623.
- [33] WOOD KJ, JONES ND, BUSHELL AR, MORRIS PJ. Alloantigen-induced specific immunological unresponsiveness. *Philos T Roy Soc Lond B: Biol Sci* 2001; **356**: 665–680.
- [34] YU XZ, ALBERT MH, MARTIN PJ, ANASETTI C. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN- $\gamma$ -dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J Clin Invest* 2004; **131**: 1624–1630.
- [35] ZAVAZAVA N, KABELITZ D. Alloreactivity and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance. *J Leuk Biol* 2000; **68**: 167–177.

*Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 07.02.2005 r.*

*Przyjęto: 21.06.2005 r.*

*ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;*

*e-mail: akorecka@biol.uw.edu.pl*



## EKSPRESJA PROTO-ONKOGENU BCL-6 W PRAWIDŁOWYCH I NOWOTWOROWYCH KOMÓRKACH B

THE PROTO-ONCOGENE BCL-6 EXPRESSION IN NORMAL  
AND MALIGNANT B CELLS

Halina ANTOSZ

Zakład Genetyki Medycznej, Akademia Medyczna, Lublin

*Streszczenie:* Ludzki protoonkogen *BCL6* koduje represor transkrypcji niezbędny do tworzenia ośrodków rozmnażania (GC), odpowiedzi T-zależnej, regulacji różnicowania komórek B oraz modulacji sygnałów z receptora limfocytów B. Wysoki poziom ekspresji *BCL6* obserwowany jest w komórkach B w GC, natomiast niski w pre-GC, w bardziej zróżnicowanych komórkach B pamięci i w plazmocytach. *BCL-6* funkcjonuje jako potencjalny represor transkrypcji różnych genów docelowych, ale jego dokładna rola jest niejasna. W chłoniakach B-komórkowych występują często strukturalne nieprawidłowości w regionie promotora *BCL6*, ponadto translokacje chromosomowe i somatyczne hipermutacje. Mutacje te reprezentują większość genetycznych zmian związanych z chłoniakami nie-Hodgkinowskimi, a szczególnie z chłoniakiem olbrzymiokomórkowym. Sugeruje się, że *BCL6* jest ważnym czynnikiem w patogenezie chłoniaków.

*Słowa kluczowe:* gen *BCL-6*, białko *BCL-6*, chłoniaki nie-Hodgkinowskie.

*Summary:* The human proto-oncogene *BCL-6*, encodes transcriptional repressor that is necessary for germinal-center formation, T cell dependent antibody responses, regulation of B cell differentiation, and B-cell receptor signaling modulation. High expression of *BCL6* is detected in GC B cells, but not in pre-GC B cells or in more differentiated memory or plasma cells. It performs a function as a potent transcriptional repressor of various target genes, but the precise function of *BCL6* in these processes is unclear. In B cell lymphomas, structural alterations of the *BCL6* promoter region, including chromosome translocation and somatic hypermutation present the most prevalent genetic lesion, especially in diffuse large cell lymphoma. *BCL-6* is suggested as an important factor in lymphomagenesis.

*Key words:* *BCL-6* gene and protein, non-Hodgkin lymphomas.

*Wykaz stosowanych skrótów:* **BCL-6** (*B-cell lymphoma*) – chłoniak B-komórkowy 6, **B-CLL** – przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa, **B-CoR** (*BCL-6 interacting corepressor*) – korepresor oddziałujący z *BCL-6*, **CTLA-4** – hamująca cząsteczka regulacyjna limfocytów T, **der** – chromosom pochodny, **DLCL** – chłoniak rozlany olbrzymiokomórkowy, **FL** – chłoniak grudkowy, **GC** – ośrodki

rozmnażania, **HDAC** – deacetylaza histonów, **Ig** – immunoglobulina, **IL-4** – interleukina 4, **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez miogeny, **N-CoR** (*nuclear receptor corepressor*) – korepresor oddziałujący z **BCL-6**, **NHL** – chłoniak nie-Hodgkinowski, **PEST** – domena łańcucha polipeptydowego bogata w prolinę, kwas glutaminowy/kwas asparaginowy – serynę – treoninę, **POZ** (*poxvirus and zing finger*) – domena białkowa, **SMRS** (*silecing mediator of retinoid and thyroid receptor*) – korepresor oddziałujący z **BCL-6**, **STAT** – stymulator transdukcji aktywator transkrypcji, **Th2** – właściwy limfocyt pomocniczy T CD4<sup>+</sup>, **ZF** – palec cynkowy.

## WPROWADZENIE

Nowotwory wywodzą się z komórek, w których doszło do mutacji kluczowych genów, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki. Wynikiem zmian mutacyjnych może być: nadmierna ekspresja proto-onkogenów lub defekt genów supresorowych. Zarówno jedne, jak i drugie geny odpowiedzialne są, między innymi, za proliferację, różnicowanie i/lub apoptozę. Mutacje mogą prowadzić do niestabilności genomowej i ostatecznie do nowotworzenia. Analiza punktów złamań chromosomów i translokacji obserwowanych w nowotworach, często przyczynia się do identyfikacji genów zaangażowanych w ten proces.

Proto-onkogen **BCL-6** zidentyfikowano ze względu na jego uczestnictwo w chromosomowych translokacjach obserwowanych w chłoniaku rozlanym olbrzymio-komórkowym (DLCL) – najbardziej pospolitej formie chłoniaka nie-Hodgkinowskiego (NHL) [10]. Następnie wykazano, że rearanżacje genu **BCL-6** mogą występować w 30–40% DLCL, 5–10% chłoniaków grudkowych (FL), 1/3 przypadków białaczki limfocytowej przewlekłej B-komórkowej (B-CLL) [2]. Zmiany genetyczne **BCL-6** mogą obejmować translokacje, w których uczestniczy chromosom 3 region q27 i somatyczne hipermutacje w regulatorowym regionie 5'.

W prawidłowych tkankach limfoidalnych, najwyższy poziom ekspresji białka **BCL-6** obserwowany jest w ośrodkach rozmnażania. Sugeruje się, że **BCL-6** funkcjonuje jako potencjalny wyciszacz transkrypcji genów, biorących udział w przekazywaniu różnych rodzajów sygnałów docierających z błony komórkowej.

## GEN I BIAŁKO BCL-6

Gen **BCL-6** obejmuje region 26 tysięcy par zasad (pz) w długim ramieniu chromosomu 3 (3q27.3) i składa się z 10 eksonów (ryc.1). Niekodujący region 5' genu **BCL-6** zawiera elementy regulatorowe dla ekspresji genu. Region promotora obejmuje 1,5 tysięcy par zasad (kz), zawiera sekwencje TATA, regulatorowe sekwencje CACCC, kasy E (ang. *E-box*) i GATA-1. Może on być odpowiedzialny za niską ekspresję genu w prawidłowych i w nowotworowych tkankach limfoidalnych, z wyjątkiem nowotworów limfoidalnych wywodzących się z ośrodków rozmnażania [49]. W niekodującym eksonie 1 **BCL6** znajdują się dwa motywy zwane BSE1A (+225 +244) i BSE1B (+249 +268), które są docelowymi, fizjologicznymi miejscami wiązania białka **BCL6**, odpowiedzialnymi za autoregulację



aktywności genu. W regionach tych dochodzi do częstych mutacji, skutkiem tego wiązanie BCL6 do BSE jest osłabione [18, 43]. Fakt ten łączy się z patogenezą DLBCL [52].

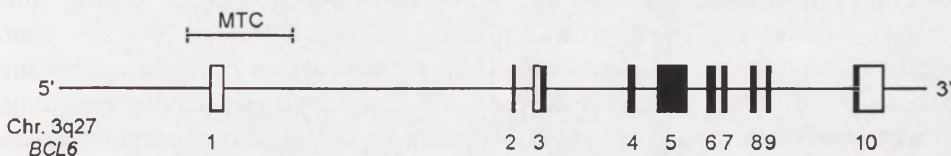
Miejscem szczególnie podatnym na zmiany mutacyjne jest koniec 3' niekodującego eksonu 1. Z tego względu określono ten obszar jako MMC (ang. *major mutation cluster*) [14]. Wykryte mutacje są różnorodne i obecne w komórkach prawidłowych i ich nowotworowych odpowiednikach [41]. Postuluje się, że zmiany mutacyjne w MMC mogą indukować zmiany chromatyny jądrowej tego regionu, w wyniku tego bardziej wzrasta podatność na rearanżacje z innymi genami [1]. Słuszność tego twierdzenia potwierdza częściowe pokrywanie się obszaru MMC z miejscami MTC (ang. *major translocation cluster*) w eksonie 1 BCL-6 [12]. Obszary podatne na translokacje zidentyfikowano zarówno powyżej, jak i poniżej pierwszego eksonu. Region obejmujący 245-285 kz powyżej pierwszego eksonu genu *BCL-6*, określono jako region ABR (ang. *alternative breakpoint region*) [16]. 126 pz poniżej 1-go eksonu zidentyfikowano obszar 781 pz, w którym ze szczególną częstością występują miejsca złamań skutkujące translokacjami międzychromosomowymi, głównie do chromosomu 14, 2, 22. Wynikiem tego są fuzje fragmentów genu *BCL6* i genów immunoglobulin łańcucha ciężkiego i łańcuchów lekkich kappa lub lambda [1,35,53].

Regulacja ekspresji *BCL-6* zachodzi na poziomie regulacji transkrypcji (w tym negatywnej autoregulacji) i w okresie potranskrypcyjnym [38]. Mechanizm tego procesu nie jest dotychczas całkowicie wyjaśniony.

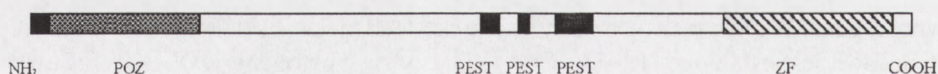
Miejsce startu translacji zlokalizowane jest w eksonie 3 [48]. mRNA o długości 3,8 kz ulega translacji do białka złożonego z 706 aminokwasów o masie cząsteczkowej 78,8 kD. BCL-6 jest jądrową fosfoproteiną, należąca do podklasy białek typu palców cynkowych (ZF). Na końcu karboksylowym występuje sześć palców cynkowych Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> typu *Krüppel*, które wiążą się w sposób specyficzny do sekwencji DNA. Na końcu aminowym występuje konserwatywna ewolucyjnie, 120-aminokwasowa domena POZ [4, 68], odpowiedzialna za oddziaływania białko-białko i za znaczną część funkcji represyjnej BCL-6 [50]. Za jej pośrednictwem do BCL-6 przyłączane są korepresory wzmacniające efekt represji transkrypcji genów docelowych.

Wewnątrz cząsteczki białka BCL6 zidentyfikowano trzy sekwencje PEST, bogate w prolinę, glutaminę i serynę – docelowe miejsca dla kinazy serynowo/treoninowej (MAPK). Są one wymagane do degradacji białka, indukowanej przez fosforylację, stąd ich nazwa – domena śmierci [47] (ryc. 2).

BCL-6 jest ewolucyjnie konserwatywnym białkiem, z niską ekspresją w różnych tkankach, ale ze szczególnie wysoką aktywnością represyjną w dojrzałych komórkach



RYCINA 1. Schemat przedstawiający locus BCL-6. Pola ciemne przedstawiają eksony kodujące, pola jasne – eksony niekodujące



RYCINA 2 Schemat cząsteczki białka BCL-6

B obecnych w ośrodkach rozmnażania węzłów chłonnych i w ich stransformowanych odpowiednikach. Ekspresji BCL-6 nie wykryto w naiwnych komórkach B w stadium pre-GC, w komórkach B pamięci post-GC ani w plazmocytach. W limfocytach o T-komórkowym rodowodzie, białko BCL-6 jest wykrywane w korowych tymocytach i w komórkach T-CD4<sup>+</sup> w ośrodkach rozmnażania. BCL-6 jest ważnym regulatorem transkrypcji w systemie immunologicznym i negatywnym regulatorem odpowiedzi Th2 [5,24]. Jego rola polega na [11,31,32]:

- regulacji kooperacji limfocytów B-T,
- tłumieniu transkrypcji genów istotnych dla prawidłowego rozwoju, aktywacji i różnicowania limfocytów,
- tworzeniu ośrodków rozmnażania (GC),
- represji genów aktywujących cykl komórkowy,
- represji genów aktywujących apoptozę w GC,
- tłumieniu genów aktywnych w stanach zapalnych,
- modulacji sygnałów przekazywanych z receptora limfocytów B (BCR).

## REGULACJA FUNKCJI BCL-6

Wyciszenie transkrypcji *BCL-6* jest warunkiem koniecznym, aby prawidłowe limfocyty B mogły opuścić ośrodki rozmnażania. Zaburzona regulacja ekspresji *BCL-6* manifestowana stałą, na znacznym poziomie aktywnością genu *BCL-6*, może być przyczyną transformacji nowotworowej, co ma miejsce np. w chłoniakach [5, 51].

W warunkach fizjologicznych kontrolę nad ekspresją *BCL-6* sprawują sygnały docierające od receptorów błonowych, tj. BCR, CD40 i receptorów mitogenów. Kontrola sprawowana jest na poziomie mRNA i białka. Badania *in vitro* wykazały, że po aktywacji angażującej wymienione receptory, dochodzi do obniżenia ekspresji mRNA *BCL-6*, w limfocytach B krwi obwodowej i śledziony [5].

Na poziomie białka stabilność BCL-6 regulują sygnały transmitowane z BCR za pośrednictwem białka RAS. Aktywne białko RAS stymuluje MAP kinazę, która fosforyluje białka BCL-6, doprowadzając do zmniejszenia jego poziomu przez degradację. Degradacja indukowana fosforylacją wymaga domen PEST. Zaangażowanie sekwencji PEST wskazuje na to, że degradacja BCL-6 odbywa się fizjologiczną drogą ubikwityna-proteasomy, czyli głównym, wieloetapowym, pozalizosomalnym szlakiem, odpowiedzialnym za degradację białek wewnątrzkomórkowych w organizmach eukariotycznych.



Kolejnym opisanym mechanizmem hamującym represyjną aktywność białka BCL-6 jest acetylacja za pośrednictwem ko-aktywatora p300. Acetylacja zapobiega przyłączeniu deacetylaz histonów do BCL-6, nie dopuszczając do represji transkrypcji docelowych genów. BCL-6 jest acetylowane zarówno w warunkach fizjologicznych w ośrodkach rozmnażania komórek B, jak również w GC pochodzących z nowotworów B-komórkowych. Acetylacja BCL-6 wspiera transkrypcję genów zwykle hamowanych przez ten represor [13, 51].

## DOCELOWE GENY DLA BCL-6

Protoonkogen BCL-6 jest genem wielofunkcyjnym. Funkcjonalne i biochemiczne dowody bezpośredniej represji transkrypcji przez BCL-6 określono tylko dla kilkunastu genów, zaangażowanych w aktywację i różnicowanie limfocytów, w izotypowe przełączenie klasy Ig, w regulację cyklu komórkowego, i w stanach zapalnych (tab.1). Precyzyjny molekularny mechanizm oddziaływania BCL-6 na geny docelowe jest niejasny. Przyjmuje się, że BCL-6 tłumi ekspresję genów przez bezpośrednie wiązanie się do elementów regulatorowych w ich promotorach [31,46,52, 62,65,64].

Unikatowymi cechami wszystkich genów docelowych BCL-6, jak również samego genu *BCL-6*, jest ich indukcja przez sygnały pozakomórkowe. Geny CD69, CD44, cyklina D2 i MIP-1 $\alpha$ , indukowane są podczas aktywacji limfocytów B przez BCR lub przez mitogeny [62], gen *PRDM* jest aktywowany przez IL-2, CD80 przez BCR, CD40 i IL-4 [26, 45]. Chemokina MCP-1 jest aktywowana przez LPS [64].

Poprzez hamowanie transkrypcji genu *CD80*, BCL-6 osłabia efekt współpracy między komórkami B i T. Antygen CD80 jest aktywną cząsteczką limfocyta B, która zwiększa efektywność prezentacji antygeny limfocytowi T. CD80 jest ligandem receptora CD28, obecnego na limfocytach T. Stymulacja CD28 przedłuża i znacznie zwiększa produkcję cytokin w tym IL-2, która jest niezbędna m.in. do prawidłowego rozwoju pomocniczych limfocytów T i zapobiega powstawaniu stanu tolerancji.

Podczas kooperacji B-T limfocyty T przejściowo wykazują na swej powierzchni ligand CD40L, który łączy się z receptorem CD40 na komórce B. Za jego pośrednictwem przekazywany jest najsilniejszy sygnał aktywujący limfocyty B. Współdziałanie CD40-CD40L ułatwia limfocytom B wejście w cykl komórkowy. Sygnalizacja za pośrednictwem CD40 odgrywa istotną rolę w izotypowym przełączeniu klasy Ig, w różnicowaniu limfocytów B do plazmocytów i w tworzeniu komórek pamięci. Sygnał z CD40 jest także konieczny do indukcji cząsteczki CD80, do odpowiedzi humoralnej na antygeny grasiczozależne i do rozwoju ośrodków rozmnażania. BCL-6 hamuje transkrypcję CD80 i wycisza jego ekspresję.

Eksperymenty na myszach z deficytem *BCL-6* wykazały wyraźny wzrost ekspresji genu *CD80* w komórkach prawidłowych [46].

Podczas prawidłowego rozwoju limfocytów, BCL-6 jest negatywnym regulatorem drogi sygnalizacji prowadzącej od BCR [48]. Przy braku sygnalizacji, komórki B

TABELA 1. Docełowe geny BCL6

Gen	Opis/funkcja docelowego genu	Literatura
CD69	marker wczesnej aktywacji limfocytów B	11, 62
CD44	obecny na wszystkich leukocytach, odgrywający rolę w adhezji i aktywacji	11, 62
EBI2	obecny na limfocytach B, aktywacja indukowana EBV	11, 62
Id2	ekspresja powszechna, negatywny regulator różnicowania komórkowego	11, 62
STAT1	ekspresja powszechna, przekaznik sygnału i aktywator transkrypcji	11, 62
CD80	ekspresja na aktywowanych komórkach B i komórkach dendrytycznych, udział w kooperacji limfocytów T-B	46
PRDM	kodujący białko Blimp-1, ekspresja w plazmacytach	11, 62
IgE	subpopulacja aktywowanych limfocytów B, przełączenie klasy, produkcja IgE	62
MIP-1 $\alpha$	chemokina, działanie prozapalne, regulacja aktywacji proliferacji i różnicowania określonych komórek, regulacja odpowiedzi immunologicznej, udział w przenoszeniu sygnału przy pomocy białek STAT i G	11, 62
IP-10	chemokina, syntetyzowana przez monocyty, makrofaagi, fibroblasty, keratynocyty, komórki śródbłonka, działanie prozapalne, regulacja aktywacji proliferacji i różnicowania określonych komórek, regulacja odpowiedzi immunologicznej	11, 62
MCP-1	monocytny czynnik chemoaktywny i aktywujący	64
MRP-1	monocytny czynnik chemoaktywny	64
Cyklina D2	ekspresja powszechna, kontrola cyklu komórkowego	11, 62
p27 <sup>kip1</sup>	ekspresja powszechna, inhibitor cyklu komórkowego, zatrzymanie cyklu w fazie G1	11, 62
CXCR4	receptor czynnika podściełkowego SDF-1, ekspresja na prekursorowych komórkach wczesnego etapu różnicowania	11, 62
PDCD2	ludzki gen programowanej śmierci komórki-2	11
p53	anty-onkogen, strażnik genomu	55
IL-5	cytoklina zaangażowana w kontrolowanie wzrostu, różnicowania i aktywacji eozynofili	8
IL-18	stymulator odpowiedzi Th1 i Th2	27



ośrodków rozmnażania wykazują wysoką ekspresję *BCL-6* i niską aktywność genów docelowych. Aktywacja BCR prowadzi do obniżenia ekspresji *BCL-6*, co pozwala na wyższy poziom indukcji genów docelowych. Dzięki takiej regulacji, *BCL-6* ma wpływ na rozwój limfocytów B również w stadium post-GC.

Istnieją dowody, że znacznie więcej genów podlega kontroli *BCL-6*, przy czym działanie to jest pośrednie, poprzez pierwotne produkty genów docelowych [62]. Za przykład może posłużyć docelowy dla *BCL-6* gen *prdm*, kodujący represor transkrypcji Blimp-1. Blimp-1 kontroluje końcowe różnicowanie limfocytów B do plazmocytów [6], hamując jednocześnie proliferację indukowaną między innymi przez geny *c-Myc* i *PAX-5* [42,56]. *BCL-6* jest negatywnym regulatorem genu *prdm*, a pozytywnym regulatorem genu *c-Myc*, mimo iż w promotorze genu *c-Myc* nie ma miejsca wiązania *BCL-6*. Hamowanie ekspresji *BCL-6* pociąga za sobą obniżenie ekspresji genu *c-MYC*, wzrost ekspresji inhibitora cyklu komórkowego  $p27^{kip1}$  i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [62].

Ostatnio [55], na listę genów podlegających bezpośredniej represji *BCL-6* został wciągnięty gen *p53*. W regionie 5' inicjacji transkrypcji genu *p53*, stwierdzono dwa miejsca wiązania dla *BCL-6*. Obniżenie ekspresji *BCL-6* ściśle wiąże się ze wzrostem zarówno podstawowego, jak i indukowanego poziomu *p53*. Wynik ten przekłada się na ekspresję genów pozostających pod kontrolą *p53*, tj. genu *p21* i genu *PUMA* – modulatora apoptozy indukowanej przez *p53*. Spekuluje się, że inhibicja ekspresji *p53* przez *BCL-6* pozwala komórkom B obecnym w GC na utrzymanie fizjologicznego, genomowego stresu (pęknięć DNA), wymaganego dla rearanżacji genomu, przełączenia klasy immunoglobulin i somatycznych hipermutacji, bez indukowania odpowiedzi apoptotycznej zależnej od *p53*.

Inhibicja transkrypcji *p53* przez *BCL-6* obserwowana jest również w nowotworach. Około 45% DLBCL, jednego z najpowszechniejszych chłoniaków, wykazuje stałą ekspresję *BCL-6* z powodu translokacji chromosomowych lub mutacji, które zmieniają jego region promotorowy. Ten typ chłoniaka charakteryzowany jest jako funkcjonalnie *p53*-negatywny [21].

## MECHANIZM REPRESJI TRANSKRYPCJI GENÓW DOCELOWYCH PRZEZ BCL-6

Represja transkrypcji odgrywa centralną rolę w wielu biologicznych procesach. Tłumienie transkrypcji koordynowane jest przez represory, korepresory, białka wpływające na utrzymanie struktur nukleosomowych itp. Białko *BCL-6* w akcji represyjnej wspierane jest przez korepresory i deacetylazy histonów (HDACs). Rola deacetylaz w tym procesie jest szczególnie podkreślana. Wspieranie funkcji represyjnej *BCL-6* przez HDAC1 dowiedziono stosując ich inhibitory, które znacząco redukowały represję transkrypcji badanych genów, powodowaną przez *BCL-6* [25].

Na podstawie homologii do sekwencji drożdżowych deacetylaz, HDACs ssaków podzielono na dwie klasy. Do klasy I. włączono HDAC1-HDAC3, do klasy II. –

HDAC4-HDAC7. U ssaków te dwie klasy są funkcjonalnie podobne [36]. HDACs wykorzystywane są przez różne represory i pewne nieligandowe receptory jądrowe (ang. *orphan receptors*). Pewne represory transkrypcji wiążą się bezpośrednio z HDACs, w innych przypadkach deacetylazy histonów są integralną komponentą większego kompleksu zawierającego korepresory.

Spośród znanych korepresorów BCL-6 wymienić należy: N-CoR, SMRT, mSIN3A mSIN3B (dwa ostatnie znane jako mSIN3) i BcoR. Domena POZ BCL6 oddziałuje z korepresorami N-CoR i SMRT, które obok mSIN3 i deacetylazy histonów HDAC1 są składowymi dużego kompleksu regulującego transkrypcję [23, 34]. Kompleks ten łączy się z promotorami docelowych genów, indukując stan represji chromatyny [25].

Z domeną POZ BCL-6 łączy się także korepresor BCoR (ang. *BCL-6 corepressor*). BCoR występuje w dwóch formach – długiej (1721 aminokwasów) i skróconej (1004 aminokwasów). Jedynie forma długa może hamować transkrypcję, jeśli przyłączy się do promotora. Oddziaływanie BCoR z domeną POZ BCL-6 jest selektywne. Potwierdziły to wyniki badań uzyskane z ośmioma innymi białkami zawierającymi domeny POZ. Jednocześnie wykazano, że BCoR może rywalizować o wiązanie domeny POZ BCL-6 z korepresorami N-CoR i SMRT, przy czym oddziaływania pomiędzy domeną POZ BCL-6 a SMRT, N-CoR i BCoR wzajemnie się wykluczają. W mechanizmie represji wspieranym przez BCoR istotną rolę odgrywają również deacetylazy histonów (klasa I i II HDAC), z którymi oddziałują obydwie formy BCoR – długa i skrócona. [34].

## MUTACJE I TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE Z UDZIAŁEM BCL-6

Somatyczne hipermutacje, to jeden z mechanizmów, w wyniku którego geny immunoglobulin są modyfikowane w limfocytach B, w celu tworzenia dużego repertuaru komórek, z których każda wykazuje ekspresję unikatowej cząsteczki przeciwciał [58]. U ludzi proces ten zachodzi w ośrodkach rozmnażania komórek B [39]. Powszechnie sądzono, że jest to cecha wyłącznie *loci* Ig, regionu zmiennego łańcucha ciężkiego i łańcuchów lekkich. Jednak badania komórek B, pochodzących z różnych chłoniaków, wykazały obecność somatycznych hipermutacji w niekodującym, regulatorowym regionie 5' genu *BCL-6* [29]. Odkrycia te zrodziły pytanie, czy hipermutacje w genie *BCL-6* związane są z jego nieprawidłową funkcją w nowotworach, czy też są efektem fizjologicznego mechanizmu podobnego do procesu hipermutacji IgV. Badania Pasqualucci i wsp. [53], prowadzone na komórkach izolowanych z migdałków dziecięcych, potwierdziły tę drugą wersję. Wykazano, że w prawidłowych komórkach B obecnych w GC, w regionie niekodującym 5' genu *BCL-6* dochodzi do somatycznych hipermutacji. Jednocześnie analizując transformowane odpowiedniki komórek B, w różnym stadium różnicowania, udowodniono istnienie ścisłego związku hipermutacji *BCL-6* i hipermutacji IgV, z przejściem komórek B przez ośrodki rozmnażania. Postuluje się zatem, że hipermutacje genu *BCL-6* mogą być rozpatrywane jako molekularny marker przejścia limfocytów B przez GC. Biologiczna rola hipermutacji *BCL-6* w rozwoju



prawidłowych i nowotworowych komórek B pozostaje niejasna. Cytowani autorzy podkreślają jednak, że funkcji limfocytów B i genezy chłoniaków, nie należy postrzegać wyłącznie w kategoriach konsekwencji mechanizmu hipermutacji genu *BCL-6*.

Obecność somatycznych mutacji *BCL-6*, z jednoczesnymi hipermutacjami genu *IgV*, wykorzystuje się do określenia komórkowego pochodzenia B-CLL.

B-CLL jest białaczką heterogenną. Występują postaci B-CLL charakteryzujące się genami *IgV* niezmutowanymi [28] lub zmutowanymi [22]. Pierwszy przypadek sugeruje obecność klonu komórek naiwnych, niedoświadczonych antygenowo, natomiast drugi pozwala na konkluzję, że klon nowotworowy wywodzi się z komórek, które przeszły przez GC. Mutacje *BCL-6* i *IgV* w B-CLL potwierdzają pogląd, że jest to białaczka histogenetycznie heterogenna.

Wykorzystując obecność synchronicznych mutacji *IgV* i *BCL-6* w B-CLL, podjęto próbę wyjaśnienia możliwości istnienia wspólnego mechanizmu ich powstawania [17, 54, 60]. Analiza 34 przypadków B-CLL przeprowadzona przez Pasqualucci i wsp. [54] wykazała, że hipermutacje *BCL-6* występują równolegle z hipermutacjami *IgV<sub>H</sub>*. Jeśli nie ma hipermutacji w *locus* genu *IgV<sub>H</sub>*, hipermutacje w genie *BCL-6* również nie występują. Ta obserwacja pozwoliła na stwierdzenie, że mechanizm powstawania mutacji *BCL-6* jest taki sam jak w przypadku hipermutacji *IgV*. Podobnie Capello i wsp. [17] wykazali zgodną dystrybucję mutacji w genach *BCL-6* i *IgV<sub>H</sub>* w B-CLL. W sprzeczności z tą opinią pozostają wyniki Sahoto i wsp. [60].

Rola mutacji somatycznych *BCL-6* w prawidłowych komórkach B w GC, jak również w ich transformowanych odpowiednikach jest obecnie nieznana. Mutacje w *locus* genu *BCL-6* nie są funkcjonalnie znaczące w B-CLL i powodują jedynie subtelne zakłócenia ekspresji tego genu. Jednocześnie wykazano, że ekspresja białka *BCL-6* w podgrupie B-CLL ze zmutowanym i niezmutowanym genem *BCL-6*, jest na znacznie niższym poziomie w porównaniu z prawidłowymi limfocytami B w GC i innymi chłoniakami [54].

Znaczenie mutacji genu *BCL-6* na przebieg B-CLL nie jest wyjaśnione. Do niedawna uważano, że występowanie mutacji *IgV* u chorych jest prognostycznie korzystniejsze, bez względu na obecność lub brak równoległej mutacji genu *BCL-6*. Ostatnie doniesienia Sarsotti i wsp. [61] podważają dotychczasowy pogląd. Cytowani autorzy przeprowadzili badania na limfocytach 95 chorych z B-CLL w stadium A wg Bineta, i niespodziewanie okazało się, że współwystępowanie mutacji *IgV<sub>H</sub>* i *BCL-6* jest skorelowane z wysokim ryzykiem progresji choroby.

Oprócz B-CLL hipermutacje w genie *BCL-6* wykazywane są również we wszystkich nowotworach wywodzących się z komórek B o fenotypie GC lub post-GC. Stwierdza się je w szpiczaku mnogim (MM), chłoniaku Burkita (BL), chłoniaku grudkowym (FL) i w chłoniaku rozlanym olbrzymiokomórkowym (DLBCL) [18, 52, 54]. Pasqualucci i wsp. [52] badali funkcjonalne konsekwencje hipermutacji genu *BCL-6* poprzez dokonywanie analizy funkcjonalnej prawidłowych limfocytów GC i limfocytów różnych typów chłoniaków. Wyniki wykazały, że wszystkie hiperzmutowane allele obecne w komórkach GC zdrowych dawców, miały porównywalną aktywność transkrypcyjną badanych genów. Podobnie, hiperzmutowane allele wywodzące się z BL, FL, B-CLL były funkcjonalnie nie do odróżnienia w porównaniu z formą bez mutacji somatycznych.

Znaczącą nadekspresję genu *BCL-6* wykazano natomiast u 33% badanych z DLBCL. Przyczyną tej nadekspresji okazały się być swoiste jedynie dla DLBCL, tzw. somatyczne „mutacje aktywujące” [67] występujące w pierwszym niekodującym eksonie *BCL-6*, zakłócające mechanizm prawidłowej, negatywnej autoregulacji, wymaganej w kontroli poziomu ekspresji *BCL-6*. Ze względu na unikatowość zidentyfikowanych zmian w motywie BSE1 (odpowiedzialnym za autoregulację *BCL6*) w DLBCL, sugeruje się, że mogą one być brane pod uwagę w patogenezie tego chłoniaka. Ponadto wykazano, że mutacje somatyczne BSE1 i translokacje regionu 3q27 wzajemnie się wykluczają.

Istnieją dowody sugerujące, że mutacje somatyczne i translokacje podlegają podobnemu mechanizmowi. Region 120 pz zlokalizowany w regionie MMC, wykazujący wysoką (aż do 35%) częstość mutacji somatycznych, obejmuje również największe skupisko punktów złamań genu *BCL-6* w chłoniakach [1]. Konsekwencją złamań są translokacje chromosomowe skutkujące zakłóceniem prawidłowej regulacji transkrypcji genu *BCL-6* [53]. Często są to translokacje wzajemne, w tych przypadkach geny fuzyjne występują w tej samej transkrypcyjnej orientacji. Translokacje z reguły obejmują niekodujący region pierwszego eksonu i pierwszego intronu genu *BCL-6*. W chłoniakach B-komórkowych, wywodzących się z ośrodków rozmnażania, nieprawidłowa ekspresja *BCL-6* jest skutkiem mechanizmu zwanego substytucją promotorową. W jej wyniku promotory genów partnerskich wstawione są powyżej kodującego eksonu *BCL-6* w chromosomie nr 3. Sekwencje kodujące dostają się zatem pod kontrolę sekwencji regulatorowych obcych genów [7,19,44,57]. Funkcjonalną konsekwencją zestawienia obok siebie sekwencji regulatorowych jednego partnera i sekwencji kodujących drugiego jest nieprawidłowa ekspresja obu genów [37].

Głównymi genami partnerskimi, zaangażowanymi w translokację z *BCL-6* w chłoniakach, są geny immunoglobulinowe łańcucha ciężkiego i łańcuchów lekkich. Proces translokacji zachodzi w limfocytach B dojrzałych, które mają zakończony proces rearanżacji regionu zmiennego [1]. Translokacje obejmują rekombinacyjne sekwencje sygnałowe *locus IgH*, rozpoznawane przez rekombinazę w procesie izotypowego przełączenia klasy Ig. Przyczyn translokacji *Ig/BCL-6* upatruje się w błędach procesu rekombinacji, ponieważ translokacje *IgH/BCL-6* zawsze obejmują tzw. region przełączenia *IgH* – rewir działania rekombinaz.

Region MTC *BCL-6*, w miejscach graniczących z delecjami, nie zawiera jednak sekwencji podobnych do rekombinacyjnych sekwencji sygnałowych Ig (heptamerowych, nonamerowych), co wyklucza uczestnictwo rekombinazy Ig w tym procesie [15].

W wyniku translokacji *IgH/BCL6* [t(3;14)(q27;q32)] powstają chromosomy pochodne, tj. der(14) i der(3), z których produkt pochodzący z chromosomu der(14) jest znacznie bardziej aktywny w porównaniu z produktem z chromosomu der(3). Dowodem jest obecność fuzyjnych transkryptów *BCL6-IgH* pozostających pod kontrolą promotora *BCL-6* w chromosomie der(14q32) [66].

Liczne badania cytogenetyczne chłoniaków NHL wykazały, że w translokacjach z *BCL6* mogą uczestniczyć poza genami *Ig* również inne geny partnerskie (tab. 2).



TABELA 2. Geny partnerskie zaangażowane w translokację BCL-6

Symbol genu	Synonim genu	Produkt genu	Locus	Choroba	Lit.
1	IgH	łańcuch ciężki Ig	14q32	DLCL, NHL, CLL, MM, chłoniak Burkita	1
2	Igκ	łańcuch lekki Igκ	2p12	NHL, chłoniak Burkita	1
3	Igλ	łańcuch lekki Igλ	22q11	NHL, chłoniak Burkita	1
4	MBNL	białko ZF homolog muscblind - <i>Drosophila</i>	3q25	FL	2
5	EIF4A2	czynnika inicjacji translokacji	3q27.3	NHL	2
6	TFR	receptor transferyny	3q29	NHL	1
7	TTF	homolog rodzyńny genu RAS	4p13	NHL	2
8	HSP90B	białko szoku termicznego	6p12	NHL	1
9	U50HG	RNA niekodujący białka	6q15	FL	2
10	SFRS3	czynniki składania 3 bogaty w argininę/serynę	6p21	NHL	20
11	H4	histon H4	6p21.3	NHL	1
12	PIM-1	Onkogen pim-1	6p21.2	DLCL	1
13	ZNFN1A1	białko ZF (palec cynkowy)	7p12	DLCL, NHL	33
14	GRHPR	reduktaza głoksalowa	9p11.2	FL	2
15	OBFI	BOBI, POU2AF1, OCA-B	11q23.1	NHL, białaczki B-komórkowe	59
16	LRMP	JAW 1	12q12.1	FL	2
17	α-NAC	alfa polipeptyd kompleksu inicjującego translację	12q23-q24.1	NHL	1
18	LCP1	L-plastin	13q14	NHL	30
19	HSP89α	białko szoku termicznego 1	14q32	NHL	1
20	CIITA	transaktywator klasy II MHC	16p13	NHL	1
21	IL21R	receptor interleukiny 21	16p11	NHL	66

## IMPLIKACJE CO DO GENEZY CHŁONIAKÓW

Częstość translokacji chromosomowych i somatycznych hipermutacji w regionie promotora *BCL-6* w chłoniakach B-komórkowych sugeruje, że zaburzenie funkcji *BCL-6* odgrywa znaczną rolę w powstawaniu chłoniaków. Wskutek translokacji, gen *BCL-6* jest regulowany przez obce promotory o stałej aktywności. Utrzymująca się, poprzez to, wysoka ekspresja *BCL-6* zapobiega obniżaniu transkrypcji *BCL-6*, co ma miejsce w czasie różnicowania limfocytów B do plazmocytów oraz powoduje nieustającą represję wszystkich docelowych genów (dla których *BCL-6* jest negatywnym regulatorem) i aktywację genów podlegających pozytywnej regulacji. Na przykład stała represja Blimp-1 jest przyczyną braku różnicowania limfocytów B do plazmocytów, natomiast stała aktywacja genu *c-Myc* może powodować nadmierną proliferację komórek. Zmieniona ekspresja *BCL-6* może sprzyjać represji genów zaangażowanych w apoptozę, np. *DCD2* [11], przyczyniając się do akumulacji komórek nowotworowych.

Udział *BCL6* w transformacji nowotworowej podkreśla się również w kontekście represji genu *p27<sup>kip1</sup>*. W warunkach prawidłowych rola białka p27 polega na zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie spoczynkowej G1, w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe. Brak funkcjonalnego białka pozwala na szybkie przejście komórki przez fazy cyklu i niekontrolowane powielanie ilości komórek. Badania wykazały, że nawet niewielkie zwiększenie poziomu *p27<sup>kip1</sup>* może podtrzymywać proliferację komórek, blokując jednocześnie ich końcowe różnicowanie, co w konsekwencji może być przyczyną transformacji nowotworowej [27].

Znaczenie translokacji 3q27 i ekspresji *BCL-6* w prognozowaniu przebiegu choroby analizowano w różnych przypadkach chłoniaków. Opisane rearanżacje *BCL-6* w DLBCL służą jako markery kliniczne. Z innych doniesień wynika, że o przeżyciu chorego decyduje translokacyjny partner *BCL-6*, ponieważ translokacje z genami innymi niż *Ig* dają gorsze prognozy w DLBCL w porównaniu z translokacjami *Ig/BCL-6* [3,9]. Istnieją jednak pojedyncze doniesienia, że rearanżacje *BCL-6* nie mają istotnego wpływu na wyniki kliniczne [40].

Do sformułowania ostatecznych wniosków dotyczących genezy chłoniaków, konieczne są dalsze badania, uwzględniające również rolę innych genów, których funkcja jest sprzężona z regulacyjną rolą *BCL-6*. Podstawowe pytania, które pozostają jak na razie bez odpowiedzi, dotyczą sposobu, w jaki deregulacja ekspresji genów docelowych przyczynia się do genezy chłoniaków i jaki jest związek między odpowiedzią *BCL-6* na różne sygnały otrzymywane z powierzchni komórek B z GC a hamowaniem transkrypcji genów docelowych.



## PIŚMIENICTWO

- [1] AKASAKA H, AKASAKA T, KURATA M, UEDA C, SHIMIZU A, UCHIYAMA T, OHNO H. Molecular anatomy of BCL-6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res* 2000; **60**: 2335–2341.
- [2] AKASAKA T, LOSSOS IS, LEVY R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003; **102**: 1443–1448.
- [3] AKASAKA T, UEDA C, KURATA M, AKASAKA H, YAMABE H, UCHIYAMA T, OHNO H. Nonimmunoglobulin (non-Ig) BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood* 2000; **96**: 2907–2909.
- [4] ALBAGLIO O, DHORDAIN P, DEWEINDT C, LECOCQ G, LEPRINCE D. The BTB/POZ domain: A New protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ* 1995; **6**: 1193–1198.
- [5] ALLMAN D, JAIN A, DENT A, MAILE RR, SEVAGGI T, KEHRY MR, STAUDT LM. BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 1996; **87**: 5257–5268.
- [6] ANGELIN-DUCLOS C, CATTORETTI G, LIN K-I, CALAME K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression *in vivo*. *J Immunol* 2000; **165**: 5462–5471.
- [7] ARIATTI C, VIVENZA D, CAPELLO D, MIGLIAZZA A, PARVIS G, FASSONE L, BUONAIUTO D, SAVINELLI F, ROSSI D, SAGLIO G, GAIDANO G. Common-variable immunodeficiency-related lymphomas associate with mutations and rearrangements of BCL-6: pathogenetic and histogenetic implications. *Hum Pathol* 2000; **31**: 871–873.
- [8] ARIMA M, TOYAMA H, ICHII I, ICHNI, KOJAMI S, OKADA S, HATANO M, CHENG G, KUBO M, FUKUDA T, TOKUHISA T. A putative silencer element in the IL-5 gene recognized by BCL6. *J Immunol* 2002; **169**: 829–836.
- [9] ARTIGA MJ, SAEZ AI, ROMERO C, SANCHEZ-BEATO M, MATEO MS, NAVAS C, MOLLEJO M, PIRIS MA. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2002; **160**: 1371–1380.
- [10] BARON BW, NUCIFORA G, McCABE N, ESPINOSA R, LE BM, McKEITHAN TW. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) w B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5262–5266.
- [11] BARON BW, ANASTASI J, THIRMAN MJ, FURUKAWA Y, FEARS S, KIM DC, SIMONE F, BIRKENBACH M, MONTAG A, SADHU A, ZELEZNIK-LE N, McKEITHAN TW. The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is target of BCL-6 repression: implications for a role of BCL-6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 2860–2865.
- [12] BASTARD C, DEWEINDT C, KERCKAERT JP, LENORMAND B, ROSSI A, PEZZELLA F, FRUCHART C, DUVAL C, MONCONDUIT M, TILLY H. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994; **83**: 2423–2427.
- [13] BERESHCHENKO O, GU W, DALLA-FAVERA R. Acetylation inactivates the BCL-6 transcriptional repressor. *Nat Genet* 2002; **32**: 606–613.
- [14] BERNADIN F, COLLYN-d'HOOGHE M, QUIEF S, BASTARD C, LEPRINCE D, KERCKAERT J-P. Small deletions occur in highly conserved regions of the LAZ3/BCL-6 major translocation cluster in one of non-Hodgkin's lymphoma without 3q27 translocation. *Oncogene* 1997; **14**: 849–855.
- [15] BERNARDIN F, COLLYN-d'HOOGHE M, QUIEF S, BASTARD C, LEPRINCE D, KERCKAERT J-P. Small deletions occur in highly conserved regions of LAZ3/BCL-6 major translocation cluster in one case of non-Hodgkin's lymphoma without 3q27 translocation. *Oncogene* 1997; **14**: 849–855.
- [16] BUTLER MP, IIDA S, CAPELLO D, ROSSI D, RAO PH, NALLASIVAM P, LOUIE DC, CHAGANTI S, AU T, GASCOYNE RD, GAIDANO G, CHAGANTI RSK, DALLA-FAVERA R. Alternative translocation breakpoint cluster region 5' to BCL-6 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2002; **62**: 4089–4094.
- [17] CAPELLO D, FAIS F, VIVENZA D, MIGLIARETTI G, CHIORAZZI N, GAIDANO G, FERRARINI M. Identification of three subgroups of b cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6 and IgV genes. *Leukemia* 2000; **14**: 811–815.

- [18] CAPELLO D, VITOLO U, PSQUALUCCI L, QUATTRONE S, MIGLIARETTI G, FASSONE L, ARIATTI C, VIVENZA C, GLOGHINI A, PASTORE C, LANZA C, NOMDEDEU J, BOTTO B, FREILONE R, CARBONE A, GAIDANO G. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* 2000; **95**: 651–659.
- [19] CHEN W, IIDA S, LOUIE DC, DALLA-FAVERA R, CHAGANTI RSK. Heterologous promoters fused to BCL-6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood* 1998; **91**: 603–607.
- [20] CHEN W, ITOYAMA T, CHAGANTI RS. Splicing factor SRP20 is a novel partner of BCL6 in a t(3;6)(q27;p21) translocation in transformed follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; **32**: 281–284.
- [21] COCO FL, YE BH, LISTA F, CORRADINI P, OFFIT K, KNOWLES DM, CHAGANTI RSK, DALLA-FAVERA R. Rearrangement of the BCL-6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994; **83**: 1757–1759.
- [22] DAMLE RN, WASIL T, FAIS F, GHIOTTO F, VALETTO A, ALLEN SL, BUCHBINDER A, BUDMAN D, DITTMAR K, KOLITZ J, LICHTMAN SM, SCHULMAN P, VINCIGUERRA VP, RAI KR, FERRARINI M, CHIORAZZI N. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1840–1847.
- [23] DELTOUR S, GUERARDEL C, LEPRINCE D. Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gamma FBP-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14831–14836.
- [24] DENT AL, SHAFFER AL, YU X, ALLMAN D, STAUDT LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997; **276**: 589–592.
- [25] DHORDAIN P, LIN RJ, QUIEF S, LANTOINE D, KERCKAERT J-P, EVANS R M, ALBAGLI O. The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Research* 1998; **26**: 4645–4651.
- [26] EVANS DE, MUNKS MW, PURKERSON JM, PARKER DC. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol* 2000; **164**: 688–697.
- [27] FERO ML, RIVKIN M, TASCH M, PORTER P, CAROW CE, FIRPO E, POLYAK K, TSAI LH, BROUDY V, PERLMUTTER RM, KAUSHANSKY K, ROBERTS JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 1996; **85**: 733–744.
- [28] FISHER M, KLEIN U, KÜPPERS R. Molecular single-cell analysis reveals that CD-5-positive peripheral blood B cells in healthy humans are characterized by rearranged V $\kappa$  genes lacking somatic mutation. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1667–1676.
- [29] GAIDANO G, CARBONE A, PASTORE C, CAPELLO D, MIGLIAZZA A, GLOGHINI A, RONCELLA S, FERRARINI M, SAGIO G, DALLA-FAVERA R. Frequent mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in acquire immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997; **89**: 3755–3762.
- [30] GALIEGUE-ZOUITINA S, QUIEF S, HILDEBRAND MP, DENIS C, DETOURMIGNIES L, LAI JL, KERCKAERT JP. Nonrandom fusion of L-plastin (LCP1) and LAZ3(BCL6) genes by t(3;13)(q27;q14) chromosome translocation in two cases of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **26**: 97–105.
- [31] HARRIS MB, CHANG CC, BERTON MT, DANIAL NN, ZHANG J, KUEHNER D, YE BH, KVATYUK M, PANDOLFI PP, CATTORETTI G, DALLA-FAVERA R, RPTHMAN PB. Transcriptional repression of Stat6-dependent interleukin-4-induced genes by BCL-6: Specific regulation of epsilon transcription and immunoglobulin E switching. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 7264–7275.
- [32] HOSAKAWA Y, MAEDA Y, SETO M. Target genes down-regulated by the BCL-6/LAZ3 oncoprotein in mouse Ba/F3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **283**: 563–568.
- [33] HOSOKAWA Y, MAEDA Y, ICHINOHASAMA R, MIURA I, TANIWAKI M, SETO M. The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2000; **95**: 2719–2721.
- [34] HUYNH DK, FISCHLE W, VERDIN E, BARDWELL VJ. BCOR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Gene & Dev* 2000; **14**: 1810–1823.
- [35] JARDLIN F, BASTARD C, CONTENTIN N, PARMENTIER F, PISQUENOT J-MTILLY H, STEVENSONFK, SAHOTA SS. Intronic BCL-6 mutations are preferentially targeted to the translocated allele in t(3;14)(q27;q32) non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Blood* 2003; **102**: 1872–1876.



- [36] KAO HY, DOWNES M, ORTENTLICH P, EVANS RM. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylase promote SMRT-mediated repression. *Genes & Dev* 2000; **14**: 2473–2484.
- [37] KENEITA Y, YOSHIDA S, ISHIGURO N, SAWADA U, HORIE T, MORI S, MORIYAMA M. Detection of reciprocal fusion 5'-BCL-6/partner-3' transcripts in lymphomas exhibiting reciprocal bcl-6 translocation. *Br J Haematol* 2001; **113**: 803–806.
- [38] KIKUCHI M, MIKI T, KUMAGAI T, FUKUDA T, KAMIYAMA R, MIYASAKA N, HIROSAWA S. Identification of negative regulatory regions within the first exon and intron of BCL-6 gene. *Oncogene* 2000; **19**: 4941–4945.
- [39] KLEIN U, GOOSSENS T, FISCHER M, KANZLER H, BRAEUNINGER A, RAJEWSKY K, KUPPERS R. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 1998; **162**: 261–280.
- [40] KRAMER MHH, HERMANS J, WIJBURG E, PHILIPPO K, GEELEN E, VAN KRIEKEN JHJM, DE JONG D, MAARTENSE E, SCHUURING E, KLUIN PM. Clinical Relevance of BCL2, BCL6, and MYC Rearrangements in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood*, 1998; **92**: 3152–3162.
- [41] LEVAL LD, FERRY JA, FALINI B, SHIPP M, HARRIS NL. Expression of bcl-6 and CD10 in primary mediastinal large B-cell lymphoma; evidence for derivation from germinal center B cells? *Am J Surg Pathol* 2001; **25**: 1277–1282.
- [42] LIN K-I, ANGELIN-DUCLOS C, KUO TC, CALAME K. Blimp-1-Dependent repression of *Pax-5* is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 4771–4780.
- [43] LOSSOS IS, LEVY R. Mutation analysis of the 5', noncoding regulatory region of the BCL-6 gene in non-Hodgkin lymphoma: evidence for recurrent mutations and intraclonal heterogeneity. *Blood* 2000; **95**: 1400–1405.
- [44] NAKAMURA Y. Internal deletions within the BCL-6 gene in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000; **38**: 505–512.
- [45] NATARAJAN K, SAHOO NC, RAO KV. Signal thresholds and modular synergy during expression of costimulatory molecules in B lymphocytes. *J Immunol* 2001; **167**: 114–122.
- [46] NIU H, CATORETTI G, DALLA-FAVERA R. BCL-6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells. *J Exp Med* 2003; **198**: 211–221.
- [47] NIU H, YE BH, DALLA-FAVERA R. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev* 1998; **12**: 1953–1961.
- [48] NIU H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematol Oncol* 2002; **20**: 155–166.
- [49] OHASHI K, MIKI T, HIROSAWA S, AOKI N. Characterization of the promotor region of the human BCL-6 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **214**: 461–467.
- [50] OKABE S, FUKUDA T, ISHIBASHI K, KOJIMA S, OKADA S, HATANO M, EBARA M, SAISHO H, TOKUHISA T. BAZF, a novel Bcl6 homolog, functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4235–4244.
- [51] PASQUALUCCI L, BERESHENKO O, NIU H, KLEIN U, BASSO K, GUGLIELMINO R, CATTORETTI G, DALLA-FAVERA R. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma* 2003; **44**, Suppl 3: S 5–12.
- [52] PASQUALUCCI L, MIGLIAZZA A, BASSO K, HOULDSWORTH J, CHAGANTI RSK, DALLA-FAVERA R. Mutations of the BCL-6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; **101**: 2914–2923.
- [53] PASQUALUCCI L, MIGLIAZZA A, FRACCHIOLLA N, WILLIAM C, NERI A, BALDINI L, CHAGANTI RS, KLEIN U, KUPPERS R, RAJEWSKY K, DALLA-FAVERA R. BCL-6 mutation in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11816–11821.
- [54] PASQUALUCCI L, NERI A, BALDINI L, DALLA-FAVERA R, MIGLIAZZA A. BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2000; **60**: 5644–5648.
- [55] PHAN RT, DALLA-FAVERA R. The BCL-6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004; **432**: 635–639.
- [56] PISKURICH JF, LIN KI, LIN Y, WANG Y, TING JP, CALAME K. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* 2000; **1**: 526–532.
- [57] QI CF, HORI M, COLEMAN AE, et al. Genomic organization and expression of BCL-6 in murine B-cell lymphomas. *Leuk Res* 2000; **24**: 719–732.

- [57a] RAJEWSKY K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; **381**: 751–758.
- [58] ROUMIER C, GALIEGUE-ZOUITINA S, BASTARD D, SOENEN V, LAI JL, DENIS C, BUCHONNET G, KERCKAERT JP, COSSON A, FENAUX P, PREUDHOMME C. FISH analysis with a YAC probe improves detection of LAZ3/BCL6 rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol J* 2000; **1**: 117–125.
- [59] SAHOTA S, DAVIS Z, HAMBLIN TJ, STEVENSEN FK. Somatic mutation of bcl-6 genes can occur in the absence of V<sub>H</sub> mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; **95**: 3534–3540.
- [60] SARSOTTI E, MARUGAN I, BENET I, TEROL MJ, SANCHEZ-IZQUIERDO D, TORMO M, RUBIO-MOSCARDO F, MARTINEZ-CLIMENT JA, GARCIA-CONDE J. BCL-6 mutation status provides clinically valuable information in early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2004; **18**: 743–746.
- [61] SHAFFER AL, YU X, HE Y, BOLDRICK J, CHAN EP, STAUDT LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000; **13**: 199–212.
- [62] TAKEDA N, ARIMA M, TSURUOKA N, OKADA S, HATANNO M, SAKAMOTO A, KOHNO Y, TOKUHISA T. Bcl6 is a transcriptional repressor for the IL-18 gene. *J Immunol* 2003; **171**: 426–431.
- [63] TONEY LM, CATTORETTI G, GRAF JA, MERGHOUB T, PANDOLFI P-P, DALLA-FAVERA R, YE BH, DENT A. BCL-6 regulates chemokine gene transcription in macrophages. *Nat Immunol* 2000; **1**: 214–220.
- [64] TUNYAPLIN C, SHAFFER AL, ANGELIN-DUCLOS CD, YU X, STAUDT LM, CALAME KL. Direct repression of prdm 1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 2004; **173**: 1158–1165.
- [65] UEDA C, AKASAKA T, KURATA T, MAESAKO Y, NISHIKORI M, ICHINOHASAMA R, IMADA K, UCHIYAMA T, OHNO H. The gene for interleukin-21 receptor is the partner of BCL-6 in t(3;16)(q27;p11), which is recurrently observed in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 2002; **21**: 368–376.
- [66] WANG X, LI A, NAGANUMA A, YE BH. Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15018–15023.
- [67] YE BH, LISTA F, LoCOCO F, KNOWLES DM, OFFIT K, CHAGANTI RSK, DALLA-FAVERA R. *Science* 1993; **262**: 747–750.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 04.05.2005 r.

Przyjęto: 25.06.2005 r.

ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin



## CZYNNIK MOLEKULARNY W ROZRODZIE. ROLA I CHARAKTERYSTYKA PRZECIWCIAŁ PRZECIWPLEMNIKOWYCH

### MOLECULAR FACTOR IN REPRODUCTION. THE ROLE AND CHARACTERISTICS OF ANTISPERM ANTIBODIES

Renata WYRZYKOWSKA, Alina DOMAGAŁA, Maciej KURPISZ\*

Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

*Streszczenie:* Ocenia się, że nieplodność w Polsce dotyka co piątą parę w wieku rozrodczym. Główną przyczyną nieplodności na tle immunologicznym jest obecność przeciwciał przeciwplemnikowych, stosunkowo niewiele jednak wiadomo na temat mechanizmów, które wywołują powstanie reakcji auto- i izoimmunologicznych u ludzi. Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom plemnika stwierdza się w surowicy krwi kobiet i mężczyzn, jak również w wydzielinach dróg rozrodczych: w płazmie nasiennej, wolne lub związane z powierzchnią plemnika, natomiast u kobiet także w śluzie szyjkowym, płynie otrzewnowym, jajowodowym oraz pęcherzykowym. Obecność przeciwciał przeciwplemnikowych może zaburzać własności rozrodcze męskiej gamety zarówno w stadium przed-, jak i pozapłodnieniowym. ASA mogą zakłócać ruch postępujący plemnika, penetrację przez plemniki śluzu szyjkowego, reakcję akrosomalną, wiązanie plemników do osłonki przejrzystej, fuzję gamety męskiej z komórką jajową oraz podziały komórkowe rozwijającego się wczesnego zarodka. Pełna identyfikacja i charakterystyka auto- i izoimmunoreaktywnych antygenów plemnikowych umożliwiłyby poznanie mechanizmów wywołujących nieplodność immunologiczną. Ponadto, szczegółowa wiedza na temat tych antygenów dostarczyłaby bardziej precyzyjnych narzędzi diagnostycznych oraz pozwoliłaby na lepsze określanie metod leczenia.

*Słowa kluczowe:* antygeny plemnikowe, nieplodność, przeciwciała przeciwplemnikowe.

*Summary:* Infertility is estimated to affect one of every five Polish couples in the reproductive age. Antisperm antibodies (ASA) are considered to be the main cause for immunological infertility, but it is still relatively little known about the specific mechanisms that elicit development of auto- and isoimmune reactions in humans. Antibodies directed to sperm antigens can be detected in serum of men and women, but also in reproductive tract secretions such as seminal fluid, where they can be bound to the sperm surface. Free ASA can be also found in cervical mucus, peritoneal, oviductal and follicular fluids of women. Presence of ASA may impair sperm fertilization capacity through various effects, interfering with pre- as well as post-fertilization stages of the reproductive process. They may affect sperm motili-

\*Autor jest stypendystą Polskiej Akademii Nauk.

ty, sperm penetration to cervical mucus, the acrosome reaction, sperm binding to zona pellucida, sperm-oocyte fusion and embryo cleavage. The detailed identification and characterization of the auto- and isoimmune reactive sperm antigens would be useful in understanding the mechanisms underlying the immunological infertility. Moreover, a precise knowledge on the sperm antigens would provide more accurate diagnostic approaches and treatment options.

*Key words:* antisperm antibodies, infertility, sperm antigens.

*Wykaz skrótów:* **LDH-C<sub>4</sub>** (*lactate dehydrogenase*) – dehydrogenaza mleczanowa; **GB-24** – antygen GB-24; **PH-20** (*posterior head-20*) – antygen tylnego regionu główki-20; **PH-30** (*posterior head-30*) – antygen tylnego regionu główki-30; **FA-1** (*fertilization antigen-1*) – związany z procesem zapłodnienia antygen-1; **FA-2** (*fertilization antigen-2*) – związany z procesem zapłodnienia antygen-2; **NZ-1** – antygen NZ-1; **NZ-2** – antygen NZ-2; **SP-10** (*sperm protein antigen-10*) – związany z białkiem plemnikowym antygen-10; **CS-1** (*cleavage signal-1*) – związane z podziałami komórkowymi białko sygnałowe-1; **SAGA-1** (*sperm agglutination antigen-1*) – aglutynujący plemniki antygen-1; **YLP-12** – antygen YLP-12.

## WSTĘP

Niepłodność została uznana przez Światową Organizację Zdrowia za chorobę cywilizacyjną. Z klinicznego punktu widzenia niepłodność oznacza niemożność zajścia w ciążę po roku regularnego współżycia bez stosowania antykoncepcji [7]. W ostatnich latach problem niepłodności narasta i nabiera znaczenia społecznego. Szacuje się, że w Polsce co piąta para ma trudności z poczęciem, przy czym 40–60% niepłodności małżeńskiej jest głównie lub częściowo spowodowana zaburzeniem zdolności prokreacyjnych mężczyzny [43]. Spadek zdolności koncepcyjnych tłumaczy się rozwojem cywilizacyjnym, zmianą stylu życia oraz większą ekspozycją na czynniki stresogenne i środowiskowe. Również zmiana statusu kobiet w społeczeństwie spowodowała, że świadomie odkładają one macierzyństwo w czasie zapominając, że wiek jest decydującym czynnikiem biologicznym w płodności [31].

Niemożność posiadania dziecka wywiera bardzo silny wpływ na stan emocjonalny pary, jest źródłem frustracji, poczucia winy i bezsilności; doprowadza do zmian w stosunkach partnerskich, konfliktów rodzinnych, a przede wszystkim rodzi poczucie niepełnej wartości. W większości przypadków pary zgłaszające się do lekarza nie są niepłodne, ale mają obniżoną płodność. Ustalenie przyczyny takiego stanu wymaga często szerokiej współpracy z innymi specjalistami, ponieważ o niepłodności najczęściej decyduje kilka czynników. W etiologii niepłodności wyróżnia się przyczyny: endokrynologiczną, anatomiczną, psychogeną, immunologiczną, idiopatyczną i inne [25].

Ze względu na wagę problemu obserwuje się olbrzymi postęp w diagnostyce i określaniu nieznanych dotąd czynników niepłodności. Stosunkowo mało poznanym zagadnieniem jest nadal niepłodność na tle immunologicznym. Sprowadza się ona do występowania u kobiet uczulenia w stosunku do antygenów własnych narządów rozrodczych, jak również obecności u kobiet (i/lub u mężczyzn) przeciwciał przeciwplemnikowych. Reaktywność immunologiczna wobec antygenów plemnikowych jest znana od dawna i w etiologii niepłodności immunologicznej ma największe znaczenie kliniczne.



## INDUKCJA REAKCJI AUTO- I IZOIMMUNOLOGICZNEJ W ODPOWIEDZI NA ANTYGENY PLEMNIKOWE

Częstość występowania przeciwciał przeciwplemnikowych (ASA, ang. *antisperm antibodies*), zarówno w populacji płodnych kobiet jak i u mężczyzn, oceniana jest na 0,9–4%, natomiast u niepłodnych osobników wynosi ona 9–36% [33]. Najwyższą ich częstość obserwuje się u pacjentów z niepłodnością o niewyjaśnionej etiologii, bowiem wynosi ona u nich od 14% do 40% [22, 28]. Oszacowanie częstości występowania ASA napotyka na pewne trudności spowodowane różną czułością i swoistością testów detekcyjnych, różnicami w interpretacji uzyskanych wyników oraz niejednorodnością badanych populacji pacjentów [10, 29].

Wciąż nie jest znany czynnik inicjujący odpowiedź układu immunologicznego na antygeny plemnikowe. U niektórych osobników płci męskiej dochodzi do uformowania przeciwciał, skierowanych przeciw autoantygenom plemnika, w różnych przedziałach funkcjonalnych układu rozrodczego i zachodzi to często spontanicznie, bez uchwytej przyczyny.

Wyróżnia się co najmniej trzy możliwe mechanizmy formowania ASA u mężczyzn. Są to: obniżenie liczebności i aktywności komórek supresorowych w układzie rozrodczym, brak lub niedobór czynników aktywujących komórki supresorowe w męskich drogach rozrodczych oraz zaburzenia w antygenowości samych plemników powodujące niewystarczającą indukcję supresji odpowiedzi immunologicznej wobec plemników. Przypuszcza się, że immunogenność męskich komórek rozrodczych może być zwiększona przez bierne zaadsorbowanie na powierzchni plemnika łańcuchów ciężkich antygenów HLA, pochodzących z ulegających degeneracji komórek nabłonkowych lub migrujących komórek układu immunologicznego. Ponadto ekspresja antygenów HLA może być spowodowana zaburzeniem procesów spermatogenezy [28].

Do najczęstszych sytuacji klinicznych, które związane są ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przeciwciał przeciwplemnikowych u mężczyzn zalicza się: operację na nasieniowodach (np. przerwanie ciągłości nasieniowodu w celach antykoncepcyjnych), uraz lub inwazyjne naruszenie bariery krew-jądro (np. rozległa biopsja jądra), skręt jądra, niedrożność męskich dróg rozrodczych, ruchomość gonad, wnetrostwo, żylaki powrózka nasiennego, uraz rdzenia kręgowego i inne [30, 36]. Powstawaniu ASA sprzyjają również wszelkie infekcje wirusowo-bakteryjne męskich narządów rozrodczych, zwłaszcza w okresie okołopokwitaniowym (w tym zapalenie ślinianek przyusznych). Ponadto powstaniu odpowiedzi immunologicznej sprzyjają kontakty homoseksualne [6]. Mężczyźni uczestniczący w stosunkach oralno-analnych wiążą naturalne autoprzeciwciała, które w pierwszej fazie oddziałują z pomocniczymi komórkami T CD4+, a następnie reagują krzyżowo lub bardziej swoicie z plemnikami [6, 47].

Zjawiskiem kontrowersyjnym jest występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych u chłopców w wieku przedpokwitaniowym, u których wystąpiły różne schorzenia w obrębie układu rozrodczego m.in. obustronne wnetrostwo jąder czy przepuklina pachwinowa [29]. Obecność ASA reagujących z antygenami dojrzałych gamet u chłopców, którzy nie mają jeszcze własnych plemników, sugeruje występowanie w przedpokwitaniowej gonadzie męskiej determinant antygenowych o strukturze moleku-

larnej podobnej do tych, które obecne są na powierzchni finalnie zróżnicowanych plemników i przez to zdolnych do reakcji z tą samą rodziną przeciwciał [14]. Syntezę ASA o szerokiej swoistości tłumaczy się również podwyższoną reaktywnością układu immunologicznego przeciw krzyżowo reagującym grupom cukrowcowym, stanowiącym wspólnie z plemnikami determinanty antygenowe czynników infekcyjnych. Zbadanie mechanizmów reakcji autoimmunologicznej u chłopców przed pokwitaniem pomogłoby w opracowaniu terapii zmniejszającej ryzyko wystąpienia problemów prokreacyjnych (obniżenia jakości nasienia, a w dalszej konsekwencji niepłodności), po osiągnięciu przez nich dojrzałości płciowej [14].

Równie dyskusyjne jest występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych u kobiet. Organizm kobiety w trakcie całego życia osobniczego poddany jest ekspozycji na ok. trylion plemników, zakładając regularnie prowadzone współżycie [47]. Przyjmuje się, że aby naturalny stan tolerancji osobnika żeńskiego na męskie komórki rozrodcze uległ załamaniu, musi zaistnieć kilka czynników usposabiających, występujących razem. Ekspozycja na opłaszczony przeciwciałami plemniki, spadek liczby supresorowych limfocytów T w szyjce macicy oraz jakość czynników immunosupresyjnych nasienia, a także obecność w nasieniu dużej liczby pomocniczych komórek T (np. wskutek infekcji), mogą prowadzić do indukcji lokalnej odpowiedzi immunologicznej w obrębie błony śluzowej żeńskich dróg rozrodczych [36 30].

Udowodniono, iż istnieje silny związek pomiędzy występowaniem ASA u kobiet, których partnerzy mają plemniki opłaszczony przeciwciałami przeciwplemnikowymi [6]. Fakt ten tłumaczy się tym, że gamety męskie indukują produkcję IFN- $\gamma$  przez limfocyty T, co prowadzi do zwiększenia ekspresji antygenów klasy II MHC na powierzchni komórek prezentujących antygen, przez co możliwe jest w następstwie dalszych reakcji rozpoznanie nowego antygeny przez pomocnicze limfocyty T ( $T_H$ ) i przekazanie przez nie sygnału do produkcji swoistych przeciwciał przeciwplemnikowych przez komórki plazmatyczne. Uważa się również, że obecność ASA u kobiet może być także związana z nieprawidłowościami w sieci immunologicznej idiotypowo - antyidiotypowej [36].

Czynnikiem predysponującym do indukcji ASA u kobiet są wszelkie infekcje bakteryjne i wirusowe dróg rozrodczych. Zjawisko to interpretuje się podobieństwem molekularnym (ang. *molecular mimicry*) determinant antygenowych drobnoustrojów chorobotwórczych (m.in. *Chlamydia*, mykoplazmy) i pojawiających się w wyniku współżycia plemników [10, 45]. Również wszelkie stany chorobowe w obrębie układu rozrodczego (nadżerki, zmiany nowotworowe, histerektoomia), mogą wzmocnić już zainicjowaną odpowiedź układu immunologicznego bądź zaburzyć pierwotny stan jego tolerancji [47].

## WPLYW OBECNOŚCI PRZECIWCIAŁ PRZECIWPLEMNIKOWYCH NA PROCESY ROZRODCZE

Przeciwciała przeciwplemnikowe, występujące zarówno u kobiet jak i mężczyzn, należą do klas IgA, IgG oraz IgM. Ze względu na znaczną heterogenność ASA nie ustalono jak dotąd, która klasa immunoglobulin jest przede wszystkim odpowiedzialna za wywoływanie niepłodności.



W surowicy krwi najczęściej stwierdza się obecność przeciwciał przeciwplemnikowych klasy IgG, natomiast w drogach rozrodczych przeważają przeciwciała klasy IgA. Immunoglobuliny IgG przesiąkają do dróg rozrodczych, a ich miano zwykle odzwierciedla stężenie ASA we krwi. Pojawienie się przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy krwi nie prowadzi do trwałej niepłodności, a jedynie do jej obniżenia. Niższe miano ASA wywołuje porównywalny spadek stopnia płodności w przypadku równoległego stwierdzenia przeciwciał przeciwplemnikowych w drogach rozrodczych, szczególnie przy pojawieniu się dimerycznej formy sekrecyjnej immunoglobuliny A [47]. Miejscowa produkcja ASA w układzie rozrodczym jest krótkotrwała i niezależna od produkcji systemowej. Ponadto oba te procesy mogą przebiegać równolegle lub oddzielnie [6].

U mężczyzn, podobnie jak u kobiet, duże znaczenie kliniczne ma miejscowa odpowiedź immunologiczna na antygeny plemnikowe. ASA pojawiają się w plazmie nasiennej i/lub są opłaszczane na powierzchni plemnika, przy czym najczęściej wiążą się do główki i końca wtki [22]. Wolne przeciwciała w plazmie wystąpią jedynie w przypadku, gdy możliwości ich adsorbowania przez plemniki zostaną przekroczone [23].

Udowodniono, że IgA nie ogranicza interakcji plemnika z komórką jajową tak silnie, jak obecność przeciwciał IgG/IgA, IgG/IgM [27, 49]. Ponadto wykazano, że spośród wszystkich klas immunoglobulin, IgM zlokalizowana na główce i końcu wtki, w największym stopniu obniża zdolność do rozpoznania, związania i fuzji męskiej gamety z komórką jajową [46].

U kobiet większość miejscowo występujących ASA produkowana jest w szyjce macicy, ponieważ w blaszce właściwej błony śluzowej (*lamina propria*) obecne są liczne komórki plazmatyczne produkujące przede wszystkim wydzielnicze immunoglobuliny klasy IgA, ale także IgG i IgM. Komórki plazmatyczne, obecne w sąsiedztwie gruczołów endometrium, są źródłem przeciwciał w macicy, która jest organem pozbawionym tkanki limfoidalnej. Natomiast źródłem ASA występujących w płynie jajowodowym jest przesącz z surowicy, przy czym ich miano zwykle nie przekracza 10% stężenia we krwi [47]. Badania przeprowadzane na modelach zwierzęcych potwierdzają, że procent ten wystarcza do zablokowania przez ASA funkcji rozrodczych gamety męskiej.

Zasadnicze działanie przeciwciał przeciwplemnikowych nie polega na mechanicznym uszkodzeniu plemnika i jego śmierci, ale na zaburzeniu jego funkcji, czego skutkiem jest zakłócenie poszczególnych etapów procesu zapłodnienia [36]. ASA mogą opłaszczać plemniki w specyficznych miejscach: na główce, zaburzając interakcję z komórką jajową, na wstawce czy końcu wtki, upośledzając ruch plemnika. Lokalizacja ta uwarunkowana jest występowaniem poszczególnych determinant antygenowych. ASA mogą również interferować z procesami przygotowującymi błonę komórkową plemnika do zapłodnienia, odbywającymi się w drogach rodnych kobiety. Wywołują wówczas przedwczesną kapacytację i/lub reakcję akrosomalną [6].

Przeciwciała przeciwplemnikowe mogą powodować aglutynację plemników, hamując tym samym ich ruch postępowy. Sieciowanie plemników może być również wywołane zarówno infekcją w narządach rozrodczych męskich, jak i zmianą środowiska chemicznego plazmy nasiennej [11].

Występowanie ASA u mężczyzn może hamować dojrzewanie plemników (najądrze), a także uszkadzać różnicujące się plemniki już w gonadzie, co obserwuje się w przypadku autoimmunologicznego zapalenia jąder. W bardzo wczesnym stadium tego schorzenia dochodzi do nacieku makrofagów lub limfocytów, które poprzez swoje działanie destrukcyjne prowadzą do oligozoospermii lub asthenozoospermii. W tym przypadku ASA są efektem towarzyszącym w stosunku do pierwotnej przyczyny choroby [47].

Głównym następstwem obecności ASA zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet jest upośledzenie penetracji śluzu szyjkowego przez plemniki. Przeciwciała przeciwplemnikowe, a szczególnie klasy IgA, wykazują zdolność do sieciowania plemników, a następnie ich kotwiczenia do glikoproteinowych micelli śluzu szyjkowego, co odbywa się za pomocą fragmentów Fc cząsteczek IgA. W rezultacie obserwuje się tzw. *shaking phenomenon*, czyli ruch witki w miejscu bez ruchu postępującego plemnika [20]. Doświadczenia wykonane na zwierzętach wykazały, że nawet te plemniki, które przedostają się przez śluz szyjkowy, nie są następnie zdolne do fuzji z komórką jajową [28].

ASA blokując miejsca receptorowe na powierzchni plemników mogą hamować ich łączenie się z osłonką przejrzystą (ZP, ang. *zona pellucida*) i/lub oolemmą, co w konsekwencji upośledza wzajemne rozpoznanie i późniejszą fuzję gamet [20]. Dowiedziono przy tym, że zaburzenie tych etapów zapłodnienia może przebiegać przy jednoczesnym braku upośledzenia penetracji śluzu szyjkowego przez plemniki [28].

Przeciwciała przeciwplemnikowe mogą także zakłócać podziały komórkowe rozwijającego się embrionu i doprowadzać do poronień nawykowych [10, 36]. Wykazano, że ASA mogą interferować z zachowanymi na powierzchni zarodka antygenami plemnikowymi, nawet w 10–14 dni po zapłodnieniu, co może prowadzić do zahamowania rozwoju zarodka. Przypuszcza się również, że poronienia mogą wystąpić na skutek stymulacji interferonu gamma przez ASA, a w konsekwencji zwiększonej ekspresji ojcowskich antygenów MHC na trofoblastycie [8, 28].

## CZY PRZECIWCIAŁA PRZECIWPLEMNIKOWE WYKAZUJĄ SWOISTOŚĆ REAGOWANIA?

Łańcuchy cukrowcowe stanowią główny składnik zewnętrznej powierzchni komórek eukariotycznych. W dorosłym organizmie ekspresja poszczególnych ugrupowań oligosacharydowych jest komórkowo specyficzna, dlatego mówi się, że komórki mają unikatowy glikotyp.

Błona komórkowa plemnika zawiera reszty cukrowcowe zarówno O-, jak i N-wiązane. Glikoproteiny O-wiązane mają wiązania pomiędzy seryną lub treoniną a N-acetylogalaktozoaminą (GalNAc), natomiast N-wiązane pomiędzy resztą asparaginową a N-acetyloglukozoaminą (GlcNAc). Większość łańcuchów glikoproteinowych zawiera szereg miejsc glikozylacji, które różnią się strukturą i miejscem przyłączenia reszt oligosacharydowych do danej sekwencji aminokwasowej. Tworzą one glikofornie, które charakteryzuje ogromna pula wariacji strukturalnych. Szacuje się, że glikokaliks komórki plemnikowej składa się z około 50 do 150 różnych glikokoniugatów. Niewiele jednak wiadomo na temat glikolipidowych komponentów plemnikowej błony komórkowej [44].



Reszty cukrowcowe, obecne na powierzchni męskich gamet, są immunogenne i indukują reakcje immunologiczne przeciwko plemnikom. Strukturalne podobieństwo glikozylowanych determinant (ang. *molecular mimicry*) na powierzchni różnych komórek powoduje, że przeciwciała mogą wchodzić w reakcje krzyżowe. Stwierdzono, że przeciwciała poliklonalne, pierwotnie wytworzone w surowicy w odpowiedzi na antygeny drobnoustrojów chorobotwórczych, mogą wtórnie reagować z determinantami antygenowymi obecnymi na plemnikach. Jeśli antygeny te są bezpośrednio zaangażowane w proces zapłodnienia, może dojść do zablokowania ich funkcji, a w rezultacie prowadzić do niepłodności na tle immunologicznym [15].

Potwierdzono krzyżową reaktywność monoklonalnych przeciwciał (mAbs, ang. *monoclonal antibodies*) przeciwplemnikowych z antygenami obecnymi na powierzchni erytrocytów oraz z glikozylowanymi antygenami różnych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [24]. Spośród 30 testowanych mAbs, skierowanych przeciwko powierzchniowym antygenom plemnikowym, aż 27 wykazało reaktywność z komórkami bakteryjnymi, przede wszystkim z *E. coli* 08, *Streptococcus viridans* i *Staphylococcus aureus*. Natomiast tylko 3 monoklonalne przeciwciała reagowały z deglikozylowanymi lipopolisacharydami ściany komórkowej szczepów *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* i *Escherichia coli* 08. Stąd wysunięto przypuszczenie, że przeciwciała przeciwplemnikowe niepłodnych kobiet i mężczyzn mogą stanowić krzyżowo reagujące przeciwciała, których produkcja została pierwotnie zainicjowana przez infekcje bakteryjne [11, 24].

Za pomocą techniki immunoprecypitacji udowodniono, że niezależnie od obecności lub braku przeciwciał przeciwplemnikowych, surowice od niepłodnych i płodnych osobników oraz od chłopców w wieku przedpokwitaniowym, mają aktywność skierowaną przeciwko antygenom komórek somatycznych (erytrocytów i limfocytów). Fakt ten interpretuje się zdolnością naturalnie występujących w surowicy przeciwciał do niespecyficznego wiązania powszechnie występujących na komórkach determinant antygenowych [16].

Powszechnie wiadomo, że przeciwciała przeciwplemnikowe występują zarówno u niepłodnych, jak i płodnych osobników, przy czym większe miano ASA stwierdza się w tej pierwszej populacji [40]. Obserwacje te sugerują, że nie wszystkie przeciwciała przeciwplemnikowe mogą w jednakowy i istotny sposób wpływać na procesy rozrodcze.

Chiu i Chamley wykazali, że ASA, obecne w surowicach od płodnych mężczyzn, mogą reagować z dokładnie tymi samymi antygenami plemnikowymi co przeciwciała obecne w surowicach od niepłodnych mężczyzn. Sugeruje się, że w reakcji tej mogą uczestniczyć różne białka, ale o tej samej masie cząsteczkowej lub że przeciwciała przeciwplemnikowe pochodzące z dwóch populacji osobników mogą rozpoznawać różne epitopy tego samego antygeny [9]. Twierdzi się również, że różnice ilościowe w stężeniu przeciwciał przeciwplemnikowych mogą w decydujący sposób determinować ich negatywny wpływ na płodność [46].

Aby zrozumieć mechanizm wywołujący niepłodność na podłożu immunologicznym, próbuje się wyodrębnić immunoreaktywne antygeny obecne na powierzchni plemników, odpowiedzialne za wywoływanie reakcji auto- i izoimmunologicznych.

Za pomocą przeciwciał monoklonalnych oraz poliklonalnych surowic od niepłodnych osób, scharakteryzowano biochemiczny i molekularny profil wielu antygenów

plemnikowych (tabela) [3, 9, 42, 45]. W niektórych przypadkach jednak nie potwierdzono ich specyficzności względem swoistych poliklonalnych przeciwciał przeciwplemnikowych zawartych w surowicach od pacjentów uczulonych *in vivo* na plemniki.

Przy użyciu techniki immunoblotowania oraz systemowo i lokalnie występujących przeciwciał przeciwplemnikowych, od płodnej i niepłodnej populacji pacjentów, wykazano, że profil immunoreaktywnych antygenów plemnikowych u niepłodnych osobników różni się w znacznym stopniu od tego, jaki reprezentowany jest u osobników płodnych [40]. Fakt ten tłumaczy się tym, że w plemnikach u niepłodnych mężczyzn mogło dojść do przedwczesnej kapacytacji lub reakcji akrosomalnej, co wiąże się z ekspozycją na działanie układu immunologicznego „ukrytych” normalnie antygenów.

Jak dotąd nie ustalono jednoznacznie, które determinanty reprezentują struktury plemnikowo-swoiste, a które reagują krzyżowo na zasadzie podobieństwa molekularnego do komórek somatycznych (erytrocytów i limfocytów) czy czynników infekcyjnych.

Mozna jednak wprowadzić umowny podział immunoreaktywnych antygenów plemnikowych na trzy grupy [16, 40]:

- Antygeny niezwiązane z procesem zapłodnienia – są to antygeny rozpoznawane przez naturalnie występujące niespecyficzne przeciwciała, pochodzące zarówno od osobników płodnych, jak i niepłodnych; niezależnie od obecności ASA. Krzyżowo reagujące przeciwciała mogą wiązać się do powierzchni plemników, erytrocytów, limfocytów oraz komórek bakteryjnych. Antygeny te nie są zaangażowane w istotny sposób w proces zapłodnienia.

- Antygeny istotne w procesie zapłodnienia – są to antygeny rozpoznawane przez przeciwciała obecne w populacji niepłodnych osób (ASA), pierwotnie produkowane w odpowiedzi na inne antygeny (somatyczne, bakteryjne) i wykazujące reaktywność zarówno wobec komórek plemnikowych, jak i somatycznych.

- Antygeny plemnikowo-swoiste – są to antygeny rozpoznawane przez swoiste przeciwciała przeciwplemnikowe występujące u niepłodnych osób (ASA), u których doszło do zaburzenia mechanizmów auto- i izotolerancji na plemniki.

Dane literaturowe na temat mas cząsteczkowych immunoreaktywnych antygenów plemnikowych, zidentyfikowanych za pomocą poliklonalnych surowic od niepłodnych kobiet i mężczyzn, są często niezgodne [1, 2, 4, 12, 45, 48]. Wskazuje to na fakt, że w indukcji odpowiedzi immunologicznej biorą udział różne antygeny powierzchniowe męskiej gamety, co pociąga za sobą upośledzenie procesu zapłodnienia na różnych etapach. Identyfikacja istotnych dla procesu zapłodnienia determinant antygenowych pozwoliłaby nie tylko na poznanie mechanizmu niepłodności immunologicznej na poziomie molekularnym, ale również na postawienie dokładnej diagnozy i określenie metod leczenia.

## LECZENIE NIEPŁODNOŚCI NA TLE IMMUNOLOGICZNYM

Leczenie niepłodności na tle immunologicznym jest procesem wielostopniowym i obejmuje działania zachowawcze, jak zmniejszenie ekspozycji na antygen, leczenie farmakologiczne, frakcjonowanie nasienia oraz inwazyjne techniki wspomaganego rozrodu.



TABELA. Wybrane autoantygeny plemnika

Antygen	Wielkość	Literatura
LDH-C4	140 kDa, 4 podjednostki, 35 kDa każda	Goldberg i wsp. (1999) [18]
GB-24	48 kDa	Fenichel i wsp. (1990) [17]
PH-20	64 kDa	Lin i wsp. (1993) [26]
PH-30	$\alpha$ – 60 kDa, $\beta$ – 44 kDa	Primakoff i wsp. (1997) [41]
FA-1	monomer 23 kDa, dimer 51 $\pm$ 2 kDa	Naz i wsp. (1993, 1998) [37, 39]
FA-2	95 kDa	Naz i wsp. (1993) [37]
NZ-1	17 kDa	Naz i wsp. (1997) [38]
NZ-2	20 kDa	Zhu i wsp. (1998) [51]
SP-10	18–34 kDa	Herr i wsp. (1990) [19]
CS-1	dimer: 14 i 18 kDa	Naz i wsp. (1992) [32], Javed i wsp. (1992) [21]
SAGA-1	15–25 kDa	Diekman i wsp. (1997) [13]
YLP-12	50 $\pm$ 5 kDa	Naz i wsp. (2002) [34, 35]

Terapia farmakologiczna kortykosteroidami pozostaje kontrowersyjna i pomimo poważnych skutków ubocznych jest nadal stosowana. Kortykosteroidy mają działanie immunosupresyjne i obniżają stężenie przeciwciał przeciwplemnikowych. W odróżnieniu od działania ogólnego, stosunkowo bezpieczna i skuteczna jest terapia miejscowa w szyjce macicy stosowana u kobiet z obecnością ASA w śluzie szyjkowym [28].

Negatywnemu efektowi, jaki wywołują związane na powierzchni komórek przeciwciała przeciwplemnikowe, próbuje się przeciwdziałać frakcjonując nasienie i usuwając plemniki opłaszczane ASA. Zwykłe odpłukiwanie przeciwciał jest mało efektywne, a ekspozycja na roztwory o dużej sile jonowej zaburza zdolność plemników do ruchu. Metody te są dostępne w bardzo wyspecjalizowanych laboratoriach.

Zastosowanie klasycznych technik wspomaganego rozrodu w leczeniu niepłodności na podłożu immunologicznym nie przynosi spodziewanych rezultatów. Odsetek niepowodzeń sięga aż 60–80% [49]. Inseminacje wewnątrzmaciczne nasieniem męża, w przypadku obecności ASA w nasieniu, są mało skuteczne [33]. W takiej sytuacji rozwiązaniem są inseminacje prawidłowym nasieniem pozyskanym od dawcy.

Pozaustrojowe zapłodnienie i transfer zarodka (IVF-ET, ang. *in vitro fertilizatio - embryo transfer*) jest zaakceptowaną i rozpowszechnioną na całym świecie metodą, a wskazania do jej stosowania obejmują prawie wszystkie czynniki etiologiczne niepłodności. Istnieje wiele modyfikacji podstawowej techniki IVF, jednak istotą każdej z nich jest zapłodnienie komórki jajowej poza ustrojem kobiety, a następnie przeniesienie

zarodka do macicy lub jajowodu. Przy wysokim wskaźniku opłaszczenia plemników przeciwciałami przeciwplemnikowymi (>50%) metody IVF-ET, jak i do jajowodowe przenoszenie zygot – ZIFT (ang. *zygote intrafallopian transfer*) zawodzą. Udowodniono, że immunologiczny czynnik męski, w przeciwieństwie do czynnika żeńskiego, determinuje w większości przypadków niepowodzenie zapłodnienia metodą IVF [33]. Zaobserwowano również, że obecność przeciwciał klasy IgA znacznie obniża wskaźnik powodzeń tylko wtedy, gdy występują one wspólnie z immunoglobuliną klasy IgM i wiążą się do główki plemnika [50]. ASA mogą interferować na kilku etapach zapłodnienia: zakłócając wiązanie plemnika do osłonki przejrzystej oocytu, blokując jej penetrację, uniemożliwiając fuzję gamet, podziały komórkowe i rozwój zarodka.

Leczenie niepłodności wywołanej immunologicznym czynnikiem męskim zrewolucjonizowały techniki mikromanipulacyjne. Mikroiniekcja plemnika pod osłonkę przejrzystą oocytów (SUZI, ang. *subzonal sperm insertion*), enzymatyczne zmiękczenie osłonki przejrzystej, przerywanie jej ciągłości w drodze chemicznej lub mechanicznej z użyciem mikromanipulatorów, czy też prosta iniekcja plemnika do cytoplazmy komórki jajowej (ICSI, ang. *intracytoplasmic sperm injection*) pozwalają pominąć te etapy zapłodnienia, które zakłócają przez ASA (przede wszystkim pierwotną interakcję plemnika z osłonką przejrzystą).

ICSI charakteryzuje wysoka skuteczność i jest to obecnie najczęściej polecana metoda leczenia pozaustrojowego w przyczynach immunologicznych [8, 29]. Potwierdzono, że obecność przeciwciał przeciwplemnikowych opłaszczających męskie gamety nie obniża wskaźnika liczby ciąż uzyskanych w metodzie ICSI (wobec innych przyczyn niepłodności), ani nie zwiększa prawdopodobieństwa samoistnych poronień [8]. Według Bohring i Krause ICSI powinno być oferowane tylko pacjentom z bardzo wysokim mianem przeciwciał przeciwplemnikowych (>50%), natomiast pozostali powinni być leczeni mniej inwazyjnymi metodami [5].

## LITERATURA

- [1] AUER J, PIGNOT-PAINTRAND I, DE ALMEIDA M. Identification of human sperm surface glycoproteins by sperm membrane-specific autoantibodies. *Hum Reprod* 1995; **10**: 551–556.
- [2] AUER J, SENECHAL H, DE ALMEIDA M. Sperm-associated and circulating IgA and IgG classes of antibodies recognise different antigens on the human sperm plasma membrane. *J Reprod Immunol* 1997; **34**: 121–136.
- [3] BOHRING C, KRAUSE E, HABERMANN B, KRAUSE W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 113–118.
- [4] BOHRING C, KRAUSE W. Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. *Am J Reprod* 2003; **50**: 411–419.
- [5] BOHRING C, KRAUSE W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. *Hum Reprod* 2003; **18**: 915–924.
- [6] BRONSON RA, FUSI FM. Autoimmunity to sperm antigens. *Immunol Allergy Clin North Amer* 1994; **14**: 773–786.



- [7] BROSENS I, GORDTS S, VALKENBURG M, PUTTEMANS P, CAMPO R, GORDTS S. Investigation of the infertile couple: when is the appropriate time to explore female infertility? *Hum Reprod* 2004; **19**: 1689–1692.
- [8] CHECK ML, CHECK JH, KATSOFF D, SUMMERS-CHASE D. ICSI as an effective therapy for male factor with antisperm antibodies. *Arch Androl* 2000; **45**: 125–130.
- [9] CHIU WWC, CHAMLEY LWC. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility. *Hum Reprod* 2002; **17**: 984–989.
- [10] CHOUDHURY SR, KNAPP LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. *Hum Reprod Update* 2000; **7**: 113–134.
- [11] CLAYTON R, MOORE H. Immunology and immunopathology of the male genital tract. Experimental models to investigate the pathology of antisperm antibodies: approaches and problems. *Hum Reprod Update* 2001; **7**: 457–459.
- [12] D'CRUZ OJ, HAAS GG, LAMBERT H. Heterogeneity of human sperm surface antigens identified by indirect immunoprecipitation of antisperm antibody bound to biotinylated sperm. *J Immunol* 1993; **151**: 1062–1074.
- [13] DIEKMAN AB, WESTBROOK-CASE VA, NAABY-HANSEN S, KLOTZ KL, FLICKINGER CJ, HERR JC. Biochemical characterization of Sperm Agglutination Antigen-1, a human sperm antigen implicated in gamete interactions. *Biol Reprod* 1997; **57**: 1136–1145.
- [14] DOMAGAŁA A, KAMIENICZNA M, KURPISZ M. Przeciwciała przeciwpłennikowe u chłopców w wieku przedpokwitaniowym. [w] Bręborowicz G. [red.] Seminarium Med. Pren. Poznań: Ośrodek Wydawnictw Naukowych 1999: t4: 185–193.
- [15] DOMAGAŁA A, KURPISZ M. Autoantygeny plemnikowe – aspekty funkcjonalne i aplikacyjne. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 497–507.
- [16] DOMAGAŁA A, KURPISZ M. Immunoprecipitation of sperm and somatic antigens with antibodies from sera of sperm-sensitized and anti-sperm antibody-free individuals. *Am J Reprod Immunol* 2004; **51**: 226–234.
- [17] FENICHEL P, DOHR G, GRIVAUX C, CERVONI F, DONZEAU M, HSI B. Localization and characterization of the acrosomal antigen recognized by GB24 on human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1990; **27**: 173–178.
- [18] GOLDBERG E, HERR JC. LDH-C<sub>4</sub> as a contraceptive vaccine. [w] Gupta SK. [red] Reproductive immunology. New Delhi: Narosa Publishing House 1999: 309–315.
- [19] HERR JC, FLICKINGER CJ, HOMYK M, KLOTZ K, JOHN E. Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP-10 from human sperm. *Biol Reprod* 1990; **42**: 181–193.
- [20] HJORT T. Antisperm antibodies and infertility: an unsolvable question? *Hum Reprod* 1999; **14**: 2423–2429.
- [21] JAVED AA, NAZ RK. Human cleavage signal-I protein: molecular cloning, transcription and immunological analysis of *in vitro* translated protein. *Gene* 1992; **112**: 205–211.
- [22] KAMIENICZNA M, DOMAGAŁA A, KURPISZ M. The frequency of antisperm antibodies in infertile couples – a Polish pilot study. *Med Sci Monit* 2003; **9**: 142–149.
- [23] KURPISZ M. Immunologia nasienia. [W] Semczuk M, Kurpisz M. [red] Andrologia. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1998: 112–128.
- [24] KURPISZ M, ALEXANDER NJ. Carbohydrate moieties on sperm surface: physiological relevance. *Fertil Steril* 1995; **63**: 158–165.
- [25] LASHEN H. Investigations for infertility. *C Obst Gynaecol* 2004; **14**: 269–276.
- [26] LIN Y, KIMMEL LH, MYLES DG, PRIMAKOFF P. Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10071–10075.
- [27] LOMBARDO F, GANDINI L, LENZI A, DONDERO F. Antisperm immunity in assisted reproduction. *J Reprod Immunol* 2004; **62**: 101–109.
- [28] MALINOWSKI A. Immunologiczne zaburzenia rozrodu. [W] Kowalski ML. [red.] Immunologia kliniczna. Łódź: Oficyna Wydawnicza 2000: 557–565.
- [29] MAZUMDAR S, LEVINE AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Fertil Steril* 1998; **70**: 799–810.
- [30] McLACHLAN RI. Basis, diagnosis and treatment of immunological infertility in men. *J Reprod Immunol* 2002; **57**: 35–45.
- [31] NAKAGAWA K, YAMANO S, MASAHARU K, HINOKIO K, MAEGAWA M, AONO T. Quality of embryo does not affect the implantation rate of IVF-ET in infertile woman with antisperm antibody. *Fertil Steril* 1999; **72**: 1055–1060.

- [32] NAZ RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol Reprod* 1992; **46**: 130–139.
- [33] NAZ RK. Modalities for treatment of antisperm antibody mediated infertility: novel perspectives. *Am J Reprod* 2004; **51**: 390–397.
- [34] NAZ RK, CHAUHAN SC. Presence of antibodies to sperm YLP<sub>12</sub> synthetic peptide in sera and seminal plasma of immunoinfertile men. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 21–26.
- [35] NAZ RK, CHAUHAN SC. Human sperm-specific peptide vaccine that causes long term reversible contraception. *Biol Reprod* 2002; **67**: 674–680.
- [36] NAZ RK, MENGE AC. Antisperm antibodies: origin, regulation, and sperm reactivity in human infertility. *Fertil Steril* 1994; **61**: 1001–1013.
- [37] NAZ RK, MORTE C, GARCIA FRAMIS V, KAPLAN P, MARTINEZ P. Characterization of a sperm-specific monoclonal antibody and isolation of 95-kilodalton fertilization antigen-2 from human sperm. *Biol Reprod* 1993; **49**: 1236–1244.
- [38] NAZ RK, ZHU X. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding for a novel testis-specific antigen. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 449–457.
- [39] NAZ RK, ZHU X. Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol Reprod* 1998; **59**: 1095–1100.
- [40] PARADISI R, BELLAVIA E, PESSION A, VENTUROLI S, FLAMIGNI C. Characterization of human sperm antigens reacting with sperm antibodies from autologous serum and seminal plasma in an infertile population. *Biol Reprod* 1996; **55**: 54–61.
- [41] PRIMAKOFF P, WOOLMAN-GAMER L, TUNG K, MYLES D. Reversible effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. *Biol Reprod* 1997; **5**: 1142–1146.
- [42] RAJEEV SK, REDDY KVR. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod* 2004; **19**: 234–242.
- [43] SANOCKA D, KURPISZ M. Infertility in Poland – present status, reasons and prognosis as a reflection of Central and Eastern Europe problems with reproduction. *Med Sci Monit* 2003; **9**: 16–20.
- [44] SCHRÖTER S, OSTERHOFF C, McARDLE W, IVELL R. The glycocalyx of the sperm surface. *Hum Reprod* 1999; **5**: 302–313.
- [45] SHETTY J, NAABY-HANSEN S, SHIBAHARA H, BRONSON R, FLICKINGER CJ, HERR JC. Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biol Reprod* 1999; **61**: 61–69.
- [46] SHIBAHARA H, SHIRAIISHI Y, HIRANO Y, SUZUKI T, TAKAMIZAWA S, SUZUKI M. Diversity of the inhibitory effects on fertilization by anti-sperm antibodies bound to the surface of ejaculated human sperm. *Hum Reprod* 2003; **18**: 1469–1473.
- [47] SKRZYPCZAK J, JĘDRZEJCZAK P, KURPISZ M, SZYMANOWSKI K. Niepłodność. [W] Słomko Z. [red.] Ginekologia. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1997: 598–658.
- [48] TSUJI Y. Carbohydrate antigens recognized by anti-sperm antibodies. Immunology of Human Reproduction, [W] Kurpisz M, Fernandez N [red.] BIOS Scientific Publishers Limited 1995: 23–32.
- [49] WOŁCZYŃSKI S, KUCZYŃSKI W, STYRNA J, SZAMATOWICZ M. Niepłodność. [W] Kurpisz M. [red.] Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. Poznań: Termedia Wydaw. Medyczne 2002: 269–289.
- [50] YEHR WR, ACOSTA AA, SELTMAN HJ, DONCEL G. Impact of immunoglobulin isotype and sperm surface location of antisperm antibodies on fertilization *in vitro* in the human. *Fertil Steril* 1995; **63**: 1287–1292.
- [51] ZHU X, NAZ RK. Cloning and sequencing of cDNA encoding for a human sperm antigen involved in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**: 176–183.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 12.05.2005 r.

Przyjęto: 30.05.2005 r.

ul. Strzeszyńska 32, 61-606 Poznań,

kurpimac@man.poznan.pl



## PRZECIWCIAŁA PRZECIWIJAJNIKOWE – IMMUNOLOGICZNY ASPEKT NIEPŁODNOŚCI

ANTIOVARIAN AUTOANTIBODIES –  
IMMUNOLOGICAL ASPECT OF INFERTILITY

Renata WYRZYKOWSKA, Maciej KURPISZ\*

Instytut Genetyki Człowieka PAN, 61-606 Poznań

**Streszczenie:** Prawidłowe funkcjonowanie gonady żeńskiej jest procesem złożonym. Niewydolność jajników może prowadzić nie tylko do zaburzeń w gospodarce hormonalnej, która jest regulowana przez cykliczne zmiany stężenia gonadotropin, ale może również spowodować wygaśnięcie uwalniania oocytów. Jakkolwiek znanych jest wiele czynników etiologicznych, próbuje się udowodnić aktywny udział mechanizmów autoimmunologicznych w dysfunkcji żeńskiej gonady i potencjalnie obniżających płodność u kobiet. Wśród zespołów chorobowych jajników, w których sugeruje się podłoże immunologiczne, wyróżnić można między innymi: niepłodność idiopatyczną, zespół przedwczesnego wygasania czynności jajników oraz zespół policystycznych jajników. Szczególną uwagę skupiają przeciwciała przeciwjajnikowe, które stanowią heterogenną grupę przeciwciał skierowaną przeciwko komponentom komórek somatycznych tkanki jajnika, jak i antygenom osłonki przejrzystej oocytu. Bezpośredni wpływ przeciwciał przeciwjajnikowych na funkcjonowanie jajnika, jak i patogenezę niepłodności, pozostaje wciąż niewyjaśniony i budzi wiele kontrowersji. Często kwestionowanym zagadnieniem wydaje się również indukcja syntezy przeciwciał przeciwjajnikowych w odpowiedzi na powtarzane zabiegi zapłodnienia pozaustrojowego. Sugeruje się, że silna hormonoterapia i punkcja pęcherzyków jajnikowych mogą powodować uwalnianie znacznych ilości wewnątrzrzarządowych antygenów jajnikowych zdolnych do wywołania reakcji autoimmunologicznej. Z całą pewnością reakcje immunologiczne pełnią istotną rolę w zaburzeniach funkcji jajników oraz w niepłodności, istnieje zatem ogromna potrzeba identyfikacji antygenów żeńskiej gonady w celu stworzenia testów diagnostycznych oraz skutecznych metod leczenia.

**Słowa kluczowe:** autoimmunizacja, jajnik, przeciwciała przeciwjajnikowe, niepłodność, IVF.

**Summary:** Human ovarian cyclic function is a complex process. Ovarian failure can lead to a loss of not only female hormonal function, which depends on cyclic changes of gonadotropin levels, but to the absence of oocytes. Whereas there are numerous factors associated with ovarian dysfunction and decreased female fertility, the autoimmune mechanisms have been put forward by several investigators. In ovarian pathology, such as idiopathic infertility, premature ovarian failure and polycystic ovarian syndrome, immunological etiology has been suggested. Special interest has been focused on antiova-

\*Autor jest stypendystą Polskiej Akademii Nauk.

rian autoantibodies directed to multiple targets, including cellular elements and oocyte-related antigens. However, the exact role of ovarian autoimmunity in these disorders still remains controversial. There are also some conflicting reports on association of antiovarian antibodies with repeated attempts of *in vitro* fertilization (IVF) procedures. Antiovary autoimmunization may be induced by repeated stimulation and puncture of ovarian follicles, probably due to the releasing of altered, immunogenic proteins from the internal layers of ovary. Since, autoimmunity plays an important role in ovarian disorders and infertility, therefore there is an increased need for identification of the specific antigens and development of standardized tests enabling a diagnosis and providing a basis for therapy.

*Key words:* autoimmunity, ovary, antiovarian antibodies, infertility, IVF.

## WSTĘP

Zaburzenia procesów rozrodczych u kobiet i mężczyzn, a co się z tym wiąże obniżenie zdolności koncepcyjnych powodują, że coraz bardziej zauważalne staje się zjawisko niepłodności człowieka. Światowa Organizacja Zdrowia definiuje niepłodność, jako niemożność zajścia w ciążę po roku regularnego współżycia bez stosowania antykoncepcji [65]. W Polsce problem niepłodności wydaje się narastać, ponieważ już co piąta para w wieku reprodukcyjnym ma trudności z poczęciem potomstwa [67].

Proces rozmnażania u ludzi uważa się za niezwykle mało efektywny, ponieważ blisko połowa uzyskanych w wyniku zapłodnienia zarodków ulega utracie przed wpływem cyklu miesięcznego [43, 66]. Szacuje się również, że ok. 25% zarodków ulega resorpcji w ciągu 7–14 dni od momentu implantacji w endometrium [19]. Wśród diagnozowanych klinicznie wczesnych poronień aż 65–90% jest spowodowana zaburzeniami chromosomalnymi, które silnie korelują z późnym wiekiem matki [43].

Wśród czynników etiologicznych niepłodności wyróżnia się przyczynę genetyczną, anatomiczną, hormonalną, infekcyjną, immunologiczną. W przypadku, gdy u obojga partnerów nie można wyjaśnić przyczyny niemożności zajścia w ciążę za pomocą dostępnych metod diagnostycznych, niepłodność taką określa się jako idiopatyczną. Badania ostatnich lat sugerują, że niepłodność niewyjaśnionego pochodzenia może mieć tło immunologiczne [10]. Z drugiej strony zaburzenia funkcji rozrodczych są często pierwszym sygnałem powstawania choroby autoimmunologicznej [54, 72].

Próby udowodnienia, że niepłodność u ludzi może mieć podłoże immunologiczne nadal są przedmiotem badań, a doniesienia i obserwacje mają często sprzeczny charakter. Wśród identyfikowanych autoprzeciwciał obecne są przeciwciała przeciwplemnikowe (ASA, ang. *antisperm antibodies*) oraz przeciwwajnikowe (AOA, ang. *antiovarian antibodies*), w tym przeciwciała skierowane przeciwko antygenom osłonki przejrzystej oocytu (AZA, ang. *anti-zonal antibodies*). Ponadto rozród mogą zakłócać przeciwciała antyfosfolipidowe (APA, ang. *anti-phospholipid antibodies*), przeciwtarczycowe (ATA, ang. *anti-thyroid antibodies*), przeciwwądrowe (ANA, ang. *anti-nuclear antibodies*), przeciwożyskowe i in. [9, 36, 38, 54 62]. Miejscowa bądź systemowa obecność wymienionych przeciwciał może zaburzać procesy rozrodcze zarówno na poziomie przed-, jak i pozapłodnieniowym. W zależności od swoistości działania immunoglobulin,



ich izotypu oraz poziomu w poszczególnych przedziałach funkcjonalnych układu rozrodczego, może dochodzić do zakłócenia rozwoju męskich i żeńskich komórek płciowych, ich wzajemnego rozpoznawania się oraz fuzji. Ponadto przeciwciała przeciw gametom oraz inne autoprzeciwciała mogą utrudniać lub uniemożliwiać podziały komórkowe zarodka, formowanie blastocysty/trofoblastu, implantację zarodka, tworzenie łożyska, czy też prawidłowe funkcjonowanie gospodarki hormonalnej kontrolującej wzrost embrionu [10, 26, 28, 54].

## IMMUNOLOGIA JAJNIKA

Jajnik nie ma wyraźnie morfologicznie wyodrębnionej bariery tkankowej oddzielającej go od czynników układu odpornościowego, jak to ma miejsce w gonadzie męskiej w postaci ścisłych połączeń zamykających tworzonych między wypustkami komórek Sertolego [18]. Komórkę jajową oddziela od warstwy komórek ziarnistych siatkowaty układ włókien glikoproteinowych osłonki przejrzystej (łac. *zona pellucida*), który poprzez połączenia szczelinowe typu *gap junction* umożliwia komunikację oocytu z warstwą ziarnistą w celu wymiany metabolitów. W rezultacie płyn pęcherzykowy, w związku z brakiem naczyń krwionośnych w warstwie ziarnistej, zawiera substancje przechodzące przez błonę podstawną na zasadzie ultrafiltracji, w tym immunoglobuliny, elektrolity, gonadotropiny, prolaktynę, podczas gdy proteoglikany oraz zależne od FSH estrogeny stanowią produkt własnej syntezy komórek ziarnistych [39]. Jajnik jest zatem organem semiuprzywilejowanym immunologicznie.

Próby poznania i zrozumienia mechanizmów dotyczących autoimmunizacji struktur tkanki jajnika były i są możliwe dzięki badaniom prowadzonym przede wszystkim na modelach zwierzęcych [17, 20, 40, 45, 69]. Udowodniono, że przeciwciała przeciwjajnikowe/przeciwoocytarne w znacznym stopniu zaburzają endokrynną i germinálną funkcję gonady żeńskiej, co ma bezpośredni wpływ na obniżenie zdolności rozrodczych, a w ostateczności może prowadzić do niepłodności.

AOA są wysoce heterogenną grupą przeciwciał skierowaną przeciwko strukturom ooplazmy, antygenom osłonki przejrzystej oocytu, komponentom komórek ziarnistych, tekalnych oraz luteinowych [36]. Obecność swoiście reagujących przeciwciał stwierdza się w surowicy i/lub w płynie pęcherzykowym, przy czym ich miano w płynie pęcherzykowym zwykle odzwierciedla stężenie immunoglobulin we krwi [47]. Badania na modelach zwierzęcych potwierdziły występowanie recyrkulujących autoprzeciwciał skierowanych przeciwko ooplazmie i osłonce przejrzystej w świetle pęcherzyków wzrastających, natomiast wykazały ich brak w pęcherzykach rdzennych (primordialnych) [68]. W warunkach fizjologicznych w świetle pęcherzyków atretycznych (zanikowych) często obserwuje się liczne jednojądrzaste komórki naciekające [18], natomiast w korze jajnika limfocyty lokalizowane się bardzo rzadko [70]. Przyjmuje się, że mechanizm przypuszczalnej immunosupresji (m.in. hamowanie infiltracji limfocytów do jajnika) działa w jego obrębie za pomocą substancji czynnych wydzielanych przez komórki śródmiąższowe gonady, a także przez same oocyty i/lub otaczające je komórki [16].

Za pomocą modelowych badań na myszach wykazano (Lou i wsp., 2000), że autoprzeciwciała wytworzone na skutek immunizacji antygenem ZP3 osłonki przejrzystej, pełnią pośrednią rolę w indukcji reakcji zapalnej w obrębie jajnika, natomiast efekt cytotoksyczny wobec funkcjonalnych pęcherzyków jajnikowych wywoływany jest przez naciekające tkankę prozapalne limfocyty T [45, 69]. W momencie, gdy przeciwciała anti-ZP wiążą się do natywnych determinant glikoproteiny ZP we wzrastających i dojrzałych pęcherzykach jajnikowych, dochodzi do migracji leukocytów z tkanki śródmiąższowej gonady (z pęcherzyków atretycznych), ich infiltracji do warstwy komórek ziarnistych, penetracji osłonki przejrzystej i niszczenia oocytu. Mechanizm ten tłumaczy się faktem, że autoprzeciwciała anti-ZP mogą zakłócać komunikację odbywającą się pomiędzy oocytem a komórkami ziarnistymi poprzez liczne połączenia szczelinowe znajdujące się w macierzy ZP, co powoduje, że zmienione komórki ziarniste rekrutują do pęcherzyków jajnikowych (na zasadzie chemotaksji) szerokie spektrum komórek zapalnych [45, 46].

Jakkolwiek próbuje się udowodnić aktywny udział czynników układu odpornościowego w dysfunkcji żeńskiej gonady, stosunkowo niewiele wiadomo na temat przyczyn tego zjawiska. Wśród zespołów chorobowych jajników, związanych z czynnikami immunologicznymi i potencjalnie obniżającymi płodność, wyróżnić można zespół przedwczesnego wygasania czynności jajników oraz zespół policystycznych jajników. Oddzielnym zagadnieniem, często kwestionowanym, wydaje się być autoimmunizacja przeciwko strukturom jajnika w odpowiedzi na powtarzane zabiegi zapłodnienia pozaustrojowego (IVF, ang. *in vitro fertilization*).

## ZESPÓŁ PRZEDWCZESNEGO WYGASANIA CZYNNOŚCI JAJNIKÓW

Przedwczesne wygasanie czynności jajników (POF, ang. *premature ovarian failure*) to pierwotna postać niewydolności jajnikowej, która występuje u kobiet poniżej 40 roku życia. Zespół ten określa się również przedwczesną menopauzą, która według danych szacunkowych dotyka 1% kobiet poniżej 40 roku życia oraz 0,1% kobiet przed 30 rokiem życia [12]. Pacjentki z POF cierpią na niepłodność wywołaną zaburzeniami endokrynnej i gametogenicznej funkcji jajników. Zespół ten uważano za chorobę nieodwracalną, istnieją jednak doniesienia o przejściowym zespole wygasania czynności jajników ze spontaniczną remisją i ciążami u pacjentek, u których biopsja gonady wykazała brak pęcherzyków primordialnych [4, 61].

POF jest heterogennym schorzeniem o bardzo złożonej patogenezie. Charakteryzuje się triadą objawów: zaburzeniem/brakiem miesiączkowania, zmniejszonym stężeniem estradiolu w surowicy krwi, zwiększonym stężeniem gonadotropin przysadkowych [47]. Cechuje się również złożoną etiologią. Wśród przyczyn POF wymienia się czynniki: genetyczny, enzymatyczny, infekcyjny, jatrogenny [41]. Potwierdzono inwazyjny wpływ chemo- i radioterapii na pęcherzyki jajnikowe, wskutek czego może dojść do ich



uszkodzenia lub przyspieszonej atrezji [41]. Efekt ten można interpretować mechanicznym uwolnieniem antygenów jajnikowych wywołującym systemową i/lub lokalną odpowiedź immunologiczną [74]. Najczęściej jednak nie można dokładnie ustalić podłoża choroby, mówi się wtedy o idiopatycznym zespole przedwczesnego wygasania czynności jajników [22, 41].

Ogólnie przyjęty jest pogląd, że kobieta rodzi się ze ściśle określoną pulą pęcherzyków primordialnych, która w okresie pokwitania wynosi ok. 400 000 [5]. W każdym cyklu zapłodnieniu ulega najczęściej tylko jedna wysoce wyselekcjonowana komórka jajowa. Proces atrezji pęcherzyków, który odbywa się w drodze apoptozy (zaprogramowanej śmierci komórki), ma na celu ograniczenie liczby komórek jajowych dostępnych do zapłodnienia. W stanach patologicznych nasilenie procesu atrezji może w sposób dramatyczny wpłynąć na obniżenie liczby pęcherzyków i znacznie przyspieszyć wyczerpanie ich całej puli [14].

Wyróżnia się dwie histopatologiczne formy zespołu: bezpęcherzykową oraz pęcherzykową [42]. Bezpęcherzykowa odmiana POF charakteryzuje się całkowitym brakiem pęcherzyków jajnikowych oraz permanentną utratą funkcji gonady. Występuje ona często w przypadku dyzgenezy gonad, rozrodzaka (ang. *dysgerminoma*) i hermafrodytyzmu [33]. Co więcej obserwuje się ją u kobiet z aberracjami chromosomowymi (o kariotypach 46, XX/47, XXX oraz 45, XO/46, XX). Natomiast w formie pęcherzykowej stwierdza się występowanie pęcherzyków wzrastających, co znacznie zwiększa szansę na spontaniczne lub indukowane przywrócenie funkcji jajników. Obecność licznych pierwotnych i niedojrzałych pęcherzyków jest cechą zespołu niewrażliwego jajnika (ROS, ang. *resistant ovary syndrome*). Sugeruje się, że zarówno pęcherzykowa, jak i bezpęcherzykowa forma zespołu POF może być wywołana autoimmunizacją żeńskiej gonady [33].

Badania ostatnich lat przemawiają za autoimmunologiczną etiologią przedwczesnego wygasania czynności jajników [3, 13, 23, 32, 33, 56]. Kierunek badań nadały obserwacje częstego współistnienia POF z chorobami z autoagresji, takimi jak: choroba Hashimoto, toczeń trzewny, choroba Gravesa-Basedowa, zapalenie tarczycy, cukrzyca insulinozależna, stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów czy trombocytopenia [3, 23, 53]. Spośród wszystkich autoimmunologicznych chorób powiązanych z POF, schorzenia tarczycy są najczęstsze i występują u 12–33% pacjentek [3, 23].

Immunologiczne tło choroby potwierdzano współistnieniem autoprzeciwciał wielogruzołowych (tarczyca, nadnercza, trzustka) [48], przeciwciał interferujących z receptorem dla gonadotropin [15, 52], a przede wszystkim przeciwciał skierowanych przeciwko poszczególnym komponentom komórkowym tkanki jajnika [22, 48, 53, 74]. Uważa się, że obecność różnych przeciwciał może być rezultatem tendencji chorób autoimmunologicznych do poliklonalnej aktywacji komórek układu odpornościowego [48].

Częstość występowania przeciwciał przeciwjajnikowych w surowicach krwi kobiet z zespołem POF waha się od 20 do 69% [13, 15, 53, 74] w zależności od pochodzenia materiału antygenowego (zwierzęcy lub ludzki), zastosowanej metody wykrywania (immunofluorescencja, test immunoenzymatyczny ELISA) oraz badanej populacji pacjentów. Wheatcroft i wsp. porównali efekty zastosowania technik: ELISA, pośredniej immunofluorescencji i immunoblotowania w detekcji przeciwciał przeciwjajnikowych [73]. W przypadku pierwszych dwóch testów uzyskane wyniki znacznie się od siebie

różniły. Natomiast w reakcji immunoblotowania, przy zastosowaniu dwóch różnych frakcji tkanki jajnikowej, nie otrzymano zgodnego układu prążków [73].

Przeciwciała przeciwjajnikowe/przeciwoocytarne są przyjętym markerem zespołu POF, jakkolwiek ich bezpośredni wpływ na funkcjonowanie jajnika, jak i patogenezę niepłodności pozostaje nadal niewyjaśniony. Sugeruje się, że przeciwciała te mogą być raczej konsekwencją, a nie powodem choroby [48]. Luborsky i wsp. sugerują, że przeciwciała przeciwjajnikowe wpływają negatywnie nie tyle na sam etap zapłodnienia lub implantacji zarodka, co na funkcjonowanie pęcherzyków jajnikowych [49]. Postulują oni, że AOA uczestniczą w stopniowej, zależnej od komplementu destrukcji pęcherzyków wzrastających, co w ostateczności prowadzi do zaburzeń, a nawet zaniku funkcji gonady żeńskiej. Wcześniejsze badania Moncayo i wsp. zdają się potwierdzać tę hipotezę [56]. Wykazali oni, że przeciwciała skierowane przeciwko receptorom LH/hCG, obecnym w ciałku żółtym (ang. *corpus luteum*), wpływają cytotoksycznie na komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych powodując obniżenie syntezy progesteronu. Źródła literaturowe potwierdzają występowanie przeciwciał przeciwko osłonce przejrzystej oocyta (ZP, ang. *zona pellucida*), które, jak się uważa, mogą zakłócać rozwój pęcherzyków jajnikowych prowadząc do zmniejszenia ich liczby i zahamowania miesiączkowania [33].

Badania przeprowadzone przez zespół Luborsky i wsp. dowiodły występowanie przeciwciał przeciwjajnikowych u 33–61% pacjentek z niepłodnością idiopatyczną, która, jak zasugerowano, może stanowić wczesne stadium autoimmunologicznego limfocytarnego zapalenia jajników, które jest dobrze poznaną przyczyną ich przedwczesnej niewydolności [48]. Podobnie jak w przypadku innych schorzeń o podłożu autoimmunologicznym (cukrzyca typu I, zapalenie tarczycy) przeciwciała przeciwjajnikowe, pojawiające się na długo przed wystąpieniem pierwszych klinicznych symptomów, mogą wskazywać na zaburzenia funkcji rozrodczych prowadzące do niepłodności [49, 73].

Autoimmunologiczne podłoże zespołu przedwczesnego wygasania czynności jajników potwierdzają doniesienia o nieprawidłowościach również w komórkowej odpowiedzi immunologicznej. U pacjentek z POF obserwuje się podwyższony poziom recyrkulujących we krwi subpopulacji limfocytów CD4+/CD8+ [23, 33, 47] oraz limfocytów B [34], zwiększoną ekspresję receptorów dla interleukiny-2 (IL-2R) [59] oraz cząsteczek MHC II na komórkach ziarnistych [31], a także wzmocnioną aktywność układu dopełniacza [72]. Równocześnie stwierdza się redukcję ilości, jak i aktywności komórek NK (ang. *natural killer*) [34] oraz czynnika TNF- $\alpha$  [58]. Ponadto wysokie miano przeciwciał przeciwjajnikowych oraz obecność limfocytów T, B i komórek NK wykazuje się w płynie pęcherzykowym [11].

Nadal nie wystarczająco wiele wiadomo na temat autoantygenów jajnikowych rozpoznawanych przez swoiste autoprzeciwciała i komórki układu odpornościowego. Jednak sugeruje się, że odpowiedź immunologiczna może być skierowana zarówno przeciwko komponentom somatycznym pęcherzyków jajnikowych (głównie komórki ziarniste i tekalne), jak i germinalnym (oocyt, osłonka przejrzysta) [23].



## ZESPÓŁ POLICYSTYCZNYCH JAJNIKÓW

Zespół policystycznych jajników (PCOS, ang. *polycystic ovarian syndrome*) jest jednym z najczęściej występujących schorzeń endokrynologicznych rozpoznawanych u kobiet w wieku rozrodczym oraz najczęstszą przyczyną niepłodności spowodowaną brakiem owulacji [1, 37]. Najistotniejszymi kryteriami rozpoznania PCOS są: hiperandrogenizm, brak owulacji oraz obecność powiększonych, wielotorbielowatych jajników w obrazie USG [35]. U kobiet z zespołem PCOS stwierdza się szeroką gamę objawów klinicznych o różnym stopniu nasilenia [6], wśród których występują: nieprawidłowości miesiączkowania, hirsutyzm, trądzik, łysienie [30]. Otyłość jest zjawiskiem powszechnym, pojawia się u 35 do 50% kobiet z PCOS, ale nie jest regułą [25].

Kryterium rozpoznawania policystycznych jajników to obecność obustronnie powiększonych gonad z przerostem komórek zrębu jajnika. Pęcherzyki, w liczbie 10 i więcej, ułożone są obwodowo, a ich średnica wynosi 2–10 mm [24]. O rozpoznaniu zespołu PCOS decyduje przede wszystkim podwyższony poziom androgenów w surowicy krwi (pochodzenia jajnikowego lub nadnerczowego), a zwłaszcza znaczne podwyższenie poziomu LH nad FSH, co jest najczęstszym powodem zahamowania folikulogenezy [7]. Niepłodność zależy w głównej mierze od nieprawidłowych cykli i jest główną dolegliwością u około 40% kobiet z zespołem policystycznych jajników.

Prawdopodobnym czynnikiem, który wywołuje hiperandrogenizm, zarówno jajnikowy, jak i nadnerczowy, może być pierwotnie występująca nieprawidłowa regulacja działania cytochromu P450-17 $\alpha$ , który katalizuje konwersję progesteronu w 17 $\alpha$ -hydroksyprogesteron, a następnie w androstendion. Nieprawidłowa regulacja metabolizmu androgenów jest prawdopodobnie zależna od podwyższonego poziomu hormonu luteinizującego (LH) [64]. Biosynteza androgenów w jajniku regulowana jest przez LH, a także prawdopodobnie przez insulinę. Uważa się, że hiperinsulinemia może być następstwem hiperandrogenizmu w wyniku wzmożonej sekrecji insuliny, zaburzeń transportu insuliny do wątroby lub defektu działania tkankowego [24]. Zaobserwowanie oporności na insulinę i hiperinsulinemii u około 80% otyłych kobiet i 30–40% kobiet z zespołem PCOS o normalnej wadze, przyczyniło się do dalszego zrozumienia patogenezy PCOS, a także udokumentowania, że zespół ten, poza zaburzeniami reprodukcyjnymi, wiąże się również z poważnymi zaburzeniami metabolicznymi [35].

Istnieją doniesienia sugerujące współzależność występowania zespołu policystycznych jajników i autoimmunizacji wobec struktur żeńskiej gonady. Lonsdale i wsp. potwierdzili występowanie heterogennych przeciwciał (przeciwjajnikowych) oraz infiltrację limfocytów do tkanki jajnika u pacjentek z PCOS [44]. Van Gelderen i Gomes dos Santos wykazali obecność przeciwciał przeciwjajnikowych skierowanych przeciwko komórkom ziarnistym pęcherzyków jajnikowych u 50% badanych kobiet z zespołem PCOS [71]. Na podstawie wyników badań, które wykazały częstość występowania swoistych AOA u pacjentek z zespołem policystycznych jajników w 44%, zespół Fenichel wysunął hipotezę, że produkcja przeciwciał przeciwjajnikowych może być związana z reakcją zapalną, która wywołuje nadmierne wytwarzanie cytokin oraz jest związana z

nadekspresją antygenów klasy II zgodności tkankowej [21]. Sugeruje się również, że intensywna produkcja cytokin może powodować nieprawidłowości w procesach metabolicznych, które są charakterystyczne dla zespołu PCOS [2].

Natomiast Rojansky i wsp. dowiedli braku przeciwciał przeciwajnikowych u 30/31 pacjentek z zespołem policystycznych jajników [63]. Znaczenie AOA w zespole PCOS podważyli również Luborsky i wsp., gdyż nie wykazali oni znaczącej różnicy w częstotliwości występowania przeciwciał przeciwajnikowych w populacji badanej i kontrolnej [65]. Reimand i wsp. potwierdzili występowanie w surowicach u pacjentek z PCOS niespecyficznych, heterogennych przeciwciał (ang. *organ-non-specific autoantibodies*), natomiast nie zaobserwowali pozytywnych reakcji wobec tkanki jajnika [62].

Nie ma zgodności, co do immunologicznej etiologii zespołu policystycznych jajników. Przypuszcza się, że reakcje autoimmunologiczne mogą być wynikiem poliklonalnej, aberrantnej odpowiedzi odpornościowej organizmu. Sugeruje się również, że autoimmunizacja może być konsekwencją, a nie powodem zespołu PCOS [51].

## PRZECIWCIAŁA PRZECIWAJNIKOWE A POWTARZANE ZABIEGI ZAPŁODNIENIA POZAUSTROJOWEGO

Wskazania do leczenia metodą pozaustrojowego zapłodnienia i transferu zarodka (IVF-ET, ang. *in vitro fertilization and embryo transfer*) obejmują prawie wszystkie czynniki etiologiczne niepłodności [8]. Leczenie metodą IVF w pierwszym etapie polega na stymulacji wzrostu licznych pęcherzyków Graafa, najczęściej za pomocą analogów GnRH (gonadoliberyny) i gonadotropin, a następnie pobraniu komórek jajowych poprzez aspirację pęcherzyków jajnikowych.

Istnieją doniesienia sugerujące, że ponawiane próby zapłodnienia *in vitro* mogą prowadzić do wywołania lub przyspieszenia wystąpienia swoistej odpowiedzi immunologicznej przeciwko tkance jajnika i powstania przeciwciał przeciwajnikowych/przeciwocytarnych [29]. Wykazano wpływ powtarzanych zabiegów IVF, u kobiet po jednej i kilku próbach pozaustrojowego zapłodnienia, na wytwarzanie przeciwciał przeciwajnikowych [55]. Stwierdzono występowanie w surowicach badanych kobiet wysokiego miana AOA wszystkich klas immunoglobulin z przewagą IgG i IgA, skierowanych przeciwko komponentom pęcherzyków jajnikowych [29]. Przypuszcza się, że silna hormonoterapia i punkcja jajników mogą powodować uwalnianie znacznych ilości, prawdopodobnie zmienionych antygenów jajnikowych, zdolnych do wywołania swoistej reakcji immunologicznej [57]. Sugeruje się nawet, że sama hiperstymulacja może spowodować syntezę przeciwciał przeciwajnikowych [8]. Efekt taki zaobserwowano po przeprowadzonym zabiegu inseminacji poprzedzonym hormonalną stymulacją jajników [48].

Barbarino-Monnier i wsp. twierdzą, że AOA klasy IgA, obecne w otoczeniu jajnika po hiperstymulacji mogą wpływać na zmiany w obrębie oocyta, natomiast recyrkulujące przeciwciała klasy IgG mogą interferować w dojrzewaniu komórek germinalnych [8]. Znany jest związek między niskim wskaźnikiem uzyskiwanych ciąż a obecnością u kobiet przeciwciał przeciwajnikowych/przeciwocytarnych, nie wiadomo jednak, jaki jest dokładny mechanizm działania tych przeciwciał [27, 28, 50].



W celu wykazania wpływu AOA na zabiegi IVF/ET Horejsi i wsp. przeanalizowali próbki płynu pęcherzykowego pochodzące od 90 kobiet poddanych wcześniej zabiegom pozaustrojowego zapłodnienia [36]. Stwierdzono występowanie przeciwciał przeciwko ooplazmie (OO), osłonce przejrzystej (ZP), komponentom komórek ziarnistych (MG), tekalnych (TI) i luteinowych (LC). Wysłunięto dalszy wniosek, że przeciwciała skierowane przeciwko ooplazmie mają ogólnie negatywny wpływ na późniejszą ciążę, zaś przeciwciała anti-ZP znacznie obniżają wskaźnik zapłodnienia pozyskanych podczas zabiegu IVF oocytów. Przeciwciała anti-TI oraz anti-LC mogą też zaburzać fazę lutealną ważną dla implantacji zarodka. Wykazano, że w grupie kobiet po nieudanej procedurze zapłodnienia pozaustrojowego największe znaczenie miały przeciwciała skierowane przeciwko komórkom ziarnistym. Twierdzi się, że wiązanie się tych przeciwciał do pęcherzyków jajnikowych może dawać wadliwy sygnał dla procesu zapłodnienia [36].

Inne badania dowodzą, że za niepowodzenie leczenia niepłodności metodą IVF w największym stopniu odpowiada obecność przeciwciał skierowanych przeciwko osłonce przejrzystej oocytu [54]. Jakkolwiek standardowa technika zapłodnienia *in vitro* (IVF) może w tych warunkach zawodzić, znacznie lepsze rokowanie uzyskuje się za pomocą metody ICSI (ang. *intracytoplasmic sperm injection*), która polega na bezpośredniej iniekcji plemnika do cytoplazmy komórki jajowej [54].

## PODSUMOWANIE

Zaburzenia procesów rozrodczych u ludzi mogą prowadzić do znacznego obniżenia zdolności koncepcji, a w ostateczności spowodować niepłodność. W stanach patologicznych może dochodzić do powstawania u kobiet (i/lub u mężczyzn) odpowiedzi auto- i izoimmunologicznej wobec antygenów plemnikowych oraz występowania u kobiet uczulenia w stosunku do własnej gonady. W celu zrozumienia mechanizmów wywołujących niepłodność na podłożu immunologicznym próbuje się identyfikować istotne dla procesu zapłodnienia determinanty antygenowe. O ile dosyć dobrze znane są immunoreaktywne antygeny powierzchniowe gamety męskiej, o tyle stosunkowo niewiele wiadomo na temat komponentów tkanki jajnika, biorących aktywny udział w indukcji syntezy swoistych przeciwciał. Fakt ten wynika ze złożoności budowy i funkcji żeńskiej gonady, na którą składają się elementy somatyczne, w postaci m.in. komórek ziarnistych, tekalnych i luteinowych, oraz germinalne (komórki jajowe). Ponadto jajnik stanowi organ semi-uprzywilejowany immunologicznie, w którym zachodzą ciągłe i dynamiczne rearanżacje mające na celu wyselekcjonowanie prawidłowej, zdolnej do zapłodnienia komórki jajowej. W przeciwieństwie do plemnika nie jest znany mechanizm autoimmunizacji żeńskiej gonady. Niewątpliwie wnikliwa analiza proteomu plemnika, jak i jajnika pozwoliłaby na zidentyfikowanie nowych antygenów pełniących istotne funkcje w fizjologii rozrodu. Ponadto umożliwiłaby zrozumienie mechanizmów wywołujących niektóre zespoły chorobowe jajników, a co najważniejsze dostarczyłaby cennego narzędzia diagnostycznego w określaniu przyczyn zaburzeń płodności [60].

## LITERATURA

- [1] ADAMS J, POLSON DD, FRANKS S. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Brit Med J* 1986; **293**: 355–359.
- [2] AHMED AFM, FATEEN B, EZZET A, RAMADAN A, BADAWY H, EL-TOBGE A. Polycystic ovary syndrome as an autoimmune disease: a new concept. *Obstet Gynecol* 2000; **95**: 48.
- [3] ALPER MM, GARNER PR. Premature ovarian failure: its relationship to autoimmune disease. *Obstet Gynecol* 1985; **66**: 27–30.
- [4] ALPER MM, JOLLY EE, GARNER PR. Pregnancies after premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; **67**: 59–62.
- [5] BAKER TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc Roy Soc (Biol)* 1963; **158**: 417–433.
- [6] BALEN A, MICHELMORE K. What is polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod* 2002; **17**: 2219–2227.
- [7] BALEN AH, CONWAY GS, KALTSAS G, TECHATRASAK K, MANNING PJ, WEST C, JACOBS HS. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod* 1995; **10**: 2107–2111.
- [8] BARBARINO-MONNIER P, GOBERT B, GUILLET-ROSSO F, BENE M, LANDES P, FAURE G. Antiovary antibodies, repeated attempts, and outcome of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1991; **56**: 928–932.
- [9] BIRDSALL MA, LOCKWOOD GM, LEDGER WL, JOHNSON PM, CHAMLEY LW. Antiphospholipid antibodies in women having *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1996; **11**: 1185–1189.
- [10] CHOUDHURY SR, KNAPP LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. *Hum Reprod Update* 2000; **7**: 113–134.
- [11] CHRISTIANSEN OB. Immunological causes of ovarian infertility and repeated implantation failure – two aspects of the same problem? *Hum Reprod* 1997; **12**: 638–639.
- [12] COULAM CB, ADAMSON SC, ANNEGERS JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; **67**: 604–606.
- [13] COULAM CB, RYAN RJ. Prevalence of circulating antibodies directed toward ovaries among women with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985; **9**: 23–24.
- [14] COULAM CB, STERN J. Immunology of ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 1991; **25**: 169–174.
- [15] DAMEWOOD MD, ZACUR HA, HOFFMAN GJ, ROCK JA. Circulating antiovarian antibodies in premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; **68**: 850–854.
- [16] DUNBAR BS. Role of ovarian antigens in fertility and infertility. [W] Kurpisz M., Fernandez N. [red] Immunology of Human Reproduction. BIOS Scientific Publishers Limited 1995: 115–132.
- [17] DUNBAR BS, LO C, STEVENS V. Effect of immunization with purified porcine zona pellucida proteins on ovarian function in baboons. *Fertil Steril* 1989; **52**: 311–318.
- [18] DUNBAR BS, PRASAD S, CARINO C, SKINNER SM. The ovary as an immune target. *J Soc Gynecol Investig* 2001; **8**: 43–48.
- [19] EDMONDS DK, LINDSAY KI, MILLER JF. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 1982; **38**: 447–453.
- [20] ERLEBACHER A, ZHANG D, PARLOW AF, GLIMCHER LH. Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J Clin Investig* 2004; **114**: 39–48.
- [21] FENICHEL P, GOBERT B, CARRE Y, BARBARINO-MONNIER P, HIERONIMUS S. Polycystic ovary syndrome in autoimmune disease. *Lancet* 1999; **353**: 2210.
- [22] FENICHEL P, SOSSET C, BARBARINO-MONNIER P, GOBERT B, HIERONIMUS S, BENE MC, HARTER M. Prevalence, specificity and significance of ovarian antibodies during spontaneous premature ovarian failure. *Hum Reprod* 1997; **12**: 2623–2628.
- [23] FORGES T, MONNIER-BARBARINO P, FAURE GC, BENE MC. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology. *Hum Reprod Update* 2004; **10**: 163–175.
- [24] FRANKS S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; **333**: 853–861.
- [25] GAMBINERI A, PELUSI C, VICENNATI V. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**: 883–896.
- [26] GEVA E, AMIT A, LERNER-GEVA L, LESSING JB. Autoimmunity and reproduction. *Fertil Steril* 1997; **67**: 599–611.
- [27] GEVA E, FAIT G, LERNER-GEVA L, LESSING JB, SWARTZ T, WOLMAN I, DANIEL Y, AMIT A. The possible role of antiovary antibodies in repeated *in vitro* fertilization failures. *Am J Reprod Immunol* 1999; **42**: 292–296.
- [28] GEVA E, VARDINON N, LESSING JB, LERNER-GEVA L, AZEM F, YOVEL I, BURKE M, YUSTI I, GRUNFELD R, AMIT A. Organ-specific autoantibodies are possible markers for reproductive failure: a prospective study in an *in-vitro* fertilization-embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1996; **11**: 1627–1631.



- [29] GOBERT B, BARBARINO-MONNIER P, GUILLET-RUSSO F, BENE MC, FAURE GC. Ovary antibodies after IVF. *Lancet* 1990; **335**: 723.
- [30] HART R, HICKEY M, FRANKS S. Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; **18**: 671–683.
- [31] HILL JA, WELCH WR, FARIS HM, ANDERSON DJ. Induction of class II major histocompatibility complex antigen expression in human granulosa cells by interferon gamma: a potential mechanism contributing to autoimmune ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol* 1990; **162**: 534–540.
- [32] HO PC, TANG WK, FU KH, FAN MC, LAWTON JWM. Immunologic studies in patients with premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1988; **71**: 622–626.
- [33] HOEK A, SCHOEMAKER J, DREXHAGE HA. Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity. *Endocr Rev* 1997; **18**: 107–134.
- [34] HOEK A, VAN KASTEREN Y, DEHAAN-MEULMAN M, SCHOEMAKER J, DREXHAGE HA. Dysfunction of monocytes and dendritic cells in patients with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 1993; **30**: 207–217.
- [35] HOMBURG R. The management of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; **1**: 109.
- [36] HOREJSI J, MARTINEK J, NOVAKOWA D, MADAR J, BRANDEJSKA M. Autoimmune antiovarian antibodies and their impact on the success of an IVF/ET program. *Ann NY Acad Sci* 2000; **900**: 351–356.
- [37] HULL MG. Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol Endocrinol* 1987; **1**: 235–245.
- [38] IJIMA T, TADA H, HIDAHA Y, MITSUDA N, MURATA Y, AMINO N. Effects of autoantibodies on the course of pregnancy and fetal growth. *Obstet Gynecol* 1997; **90**: 364–369.
- [39] JAKOWICKI JA. Jajnik. [W] Kurpisz M. [red] Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. Poznań: Termedia Wydawnictwa Medyczne 2002: 115–126.
- [40] KAIDER BD, COULAM CB, ROUSSEV RG. Murine embryos as a direct target for some human autoantibodies *in vitro*. *Hum Reprod* 1999; **14**: 2556–2561.
- [41] KALANTARIDOU SN, DAVIS SR, NELSON LM. Premature Ovarian Failure. *Enocrinol Met Clin Nort Am* 1998; **27**: 989–1007.
- [42] KINCH RAH, PLUNKETT ER, SMOUT MS, CARR DH. Primary ovarian failure: a clinicopathological and cytogenetic study. *Am J Obstet Gynecol* 1965; **91**: 630–641.
- [43] LOCKWOOD CJ. Prediction of pregnancy loss. *Lancet* 2000; **355**: 1292–1293.
- [44] LONSDALE R, ROBERTS P, TROWELL J. Autoimmune oophoritis associated with polycystic ovaries. *Histopathology* 1991; **19**: 77–81.
- [45] LOU Y, PARK K, AGERSBORG S, ALARD P, TUNG K. Retargeting T cell-mediated inflammation: a new perspective on autoantibody action. *J Immunol* 2000; **164**: 5251–5257.
- [46] LOU Y, TUNG K. T cell peptide of a self-protein elicits autoantibody to the protein antigen. *J Immunol* 1993; **151**: 5790–5799.
- [47] LUBORSKY J. Ovarian autoimmune disease and ovarian autoantibodies. *J Women's Health Gend Based Med* 2002; **11**: 585–599.
- [48] LUBORSKY J, LLANES B, DAVIES S, BINOR Z, RADWANSKA E, PONG R. Ovarian Autoimmunity: Greater Frequency of Autoantibodies in Premature Menopause and Unexplained Infertility Than in the General Population. *Clin Immunol* 1999; **90**: 368–374.
- [49] LUBORSKY J, LLANES B, ROUSSEV R, COULAM C. Ovarian antibodies, FSH and inhibin B: independent markers associated with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2000; **15**: 1046–1051.
- [50] LUBORSKY J, PONG R. Pregnancy outcome and ovarian antibodies in infertility patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Am J Reprod Immunol* 2000; **44**: 261–265.
- [51] LUBORSKY JL, SHATAVI S, ADAMCZYK P, CHIONG C, LLANES B, LAFNITZEGGER J, SOLTES B, McGOVERN P, SANTORO N. Polycystic ovary syndrome and ovarian autoimmunity – assessment of ovarian antibodies by EIA. *J Reprod Immunol* 1999; **42**: 79–84.
- [52] LUBORSKY JL, THIRUPATHI P, RIVNAY B, ROUSSEV R, COULAM C, RADWANSKA E. Evidence for different aetiologies of low estradiol response to FSH: age-related accelerated luteinization of follicles or presence of ovarian antibodies? *Hum Reprod* 2002; **17**: 2641–2649.
- [53] LUBORSKY JL, VISINTIN I, BOYERS S, ASARI T, CALDWELL B, DECHERNEY A. Ovarian antibodies detected by immobilized antigen immunoassay in patients with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **70**: 69–75.
- [54] MARDESIC T, ULCOVA-GALOVA Z, HUTTELOVA R, MULLER P, VOBORIL J, MIKOVA M, HULVERT J. The influence of different types of antibodies on *in vitro* fertilization results. *Am J Reprod Immunol* 2000; **43**: 1–5.

- [55] MEYER WR, LAVY G, DeCHERNEY A, VISINTIN I, ECONOMY K, LUBORSKY J. Evidence of gonadal and gonadotropin antibodies in women with a suboptimal ovarian response to exogenous gonadotropin. *Obstet Gynecol* 1990; **75**: 795–799.
- [56] MONCAYO H, MONCAYO R, BENZ R, WOLF A, LAURITZEN CH. Ovarian Failure and Autoimmunity. Detection of Autoantibodies Directed against Both the Unoccupied Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor and the Hormone-receptor Complex of Bovine *Corpus Luteum*. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1857–1865.
- [57] MONCAYO R, MONCAYO H, DAPUNT O. Immunological risks of IVF. *Lancet* 1990; **335**: 180.
- [58] NAZ RK, THURSTON D, SANTORO N. Circulating tumor necrosis factor (TNF)-alpha in normally cycling women and patients with premature ovarian failure and polycystic ovaries. *Am J Reprod Immunol* 1995; **34**: 170–175.
- [59] NELSON LM, KIMZEY LM, MERRIAM GR, FLEISHER TA. Increased peripheral T lymphocyte activation in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1991; **55**: 1082–1087.
- [60] PETRICOIN III EF, ARDEKANI AM, HITT BA, LEVINE PJ, FUSARO VA, STEINBERG SM, MILLS GB, SIMONE C, FISHMAN DA, KOHN EC, LIOTTA LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; **359**: 572–577.
- [61] REBAR RW, CONNOLLY HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 1990; **53**: 804–810.
- [62] REIMAND K, TALJA I, METSKULA K, KADASTIC U, MATT K, UIBO R. Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2001; **51**: 167–176.
- [63] ROJANSKY N, ROLL D, MEIROW D. Polycystic ovary syndrome. An autoimmune disease? *J Reprod Med* 1997; **42**: 325–328.
- [64] ROSENFELD RL, BARNES RB, CARA JF, LUCKY AW. Dysregulation of cytochrome P450c17 alpha as the cause of polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 1990; **53**: 785–791.
- [65] ROWE PJ, COMHAIRE FH, HARGREAVE TB, MELLOWS HJ. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. World Health Organization, 1993.
- [66] SALMON JE. A noninflammatory pathway for pregnancy loss: innate immune inactivation. *J Clin Invest* 2004; **114**: 15–17.
- [67] SANOCKA D, KURPISZ M. Infertility in Poland – present status, reasons and prognosis as a reflection of Central and Eastern Europe problems with reproduction. *Med Sci Monit* 2003; **9**: 16–20.
- [68] TAGUCHI O, NISHIZUKA Y, SAKAKURA T, KOJIMA A. Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: Detection of circulating antibodies against oocytes. *Clin Exp Immunol* 1980; **40**: 540–553.
- [69] TUNG KSK, GARZA KM, LOU Y, BAGAVANT H. Autoimmune ovarian disease: mechanism of induction and prevention. *J Soc Gynecol Investig* 2001; **8**: 49–51.
- [70] USHIOGOE K, IRAHARA M, FUKUMOCHI M, KAMADA M, AONO T. Production and regulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat ovulation. *Biol Reprod* 2000; **63**: 121–126.
- [71] VAN GELDEREN C, GOMES DOS SANTOS M. Polycystic ovarian syndrome. Evidence for an autoimmune mechanism in some cases. *J Reprod Med* 1993; **38**: 381–386.
- [72] WHEATCROFT NJ, ROGERS CA, METCALFE RA, LENTON EA, COOKE ID, WEETMAN AP. Is subclinical ovarian failure an autoimmune disease? *Hum Reprod* 1997; **12**: 244–249.
- [73] WHEATCROFT NJ, SALT C, MILFORD-WARD A, COOKE ID, WEETMAN AP. Identification of ovarian antibodies by immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay or immunoblotting in premature ovarian failure. *Hum Reprod* 1997; **12**: 2617–2622.
- [74] WHEATCROFT NJ, TOOGOOD AA, LI TC, COOKE ID, WEETMAN AP. Detection of antibodies to ovarian antigens in women with premature ovarian failure. *Clin Exp Immunol* 1994; **96**: 122–128.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 12.05.2005 r.

Przyjęto: 08.06.2005 r.

ul. Strzeszyńska 32, 61-606 Poznań

kurpimac@man.poznan.pl



## STRUKTURA I AKTYWACJA PŁYTEK KRWI ORAZ ICH ZASTOSOWANIE JAKO KOMÓREK MODELOWYCH

BLOOD PLATELETS AS PHARMACOLOGICAL MODEL

Joanna SIKORA<sup>1</sup>, Barbara KOSTKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika Chorób Wewnętrznych z Oddziałem Farmakologii Klinicznej i Terapii Monitorowanej, <sup>2</sup>Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

*Streszczenie* Komórki i składniki krwi są szczególnie narażone na kontakt z substancjami w różny sposób wprowadzanymi do krwioobrotu, nawet tymi szybko metabolizowanymi i wydalonymi. Płytki krwi, mimo że nie posiadają jądra komórkowego, są wysoce zorganizowanymi, bogatymi w liczne organelle komórkami. Reagują sekrecją aktywnych związków zmagazynowanych w specyficznych ziarnistościach nawet na bardzo małe ilości krążących molekuł. Dlatego płytka krwi od lat jest wykorzystywana jako komórka modelowa w badaniach farmakologicznych leków. Dotyczy to nie tylko badań hemostazy, ale także innych komórek, np. neuronów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Praca ta przedstawia główne informacje dotyczące budowy, aktywacji (i metod jej oceny) oraz wykorzystania płytek krwi jako modelu farmakologicznego.

*Słowa kluczowe:* płytki krwi, receptory płytkowe, metody pomiaru aktywacji płytek krwi, model farmakologiczny.

*Summary:* Blood cells are exposed to any agent absorbed or injected into the bloodstream, even those rapidly metabolised and extracted. Although anucleated, blood platelets are highly organized cells, rich in different types of organelles. They respond to small amounts of circulating molecules by secreting a number of active compounds stored in specific granules. That's the reason blood platelets are used as pharmacological model for new drugs evaluation for many years. The use of platelets as models has not only been confined to coagulation assay but also has extended to other cell types like: neuronal cells and vascular smooth muscle cells. This review presents the main information about structure of blood platelets, their activation, methods for monitoring of their function and using platelets as pharmacological model.

*Keywords:* platelets, platelet receptors, platelet function assays, pharmacological model.

## STRUKTURA I FUNKCJA PŁYTEK KRWI

Płytki krwi (PK) to najmniejsze, niemające jąder elementy morfotyczne krwi obwodowej i szpiku. Są fragmentami cytoplazmy megakariocytów szpiku kostnego i płuc. Prawidłowe płytki krwi mają kształt dyskoidalny, średnicę  $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$  i objętość  $7,06 \pm 4,85 \mu\text{m}^3$ . Ich liczba u zdrowych osób wynosi  $140\text{--}440 \cdot 10^9/\text{L}$ . PK przeżywają od 8 do 12 dni i są usuwane z krwioobiegu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Około 30% całkowitej masy PK znajduje się w śledzionie, stanowiąc tzw. pulę wymienialną [17].

PK są niezwykle reaktywnymi komórkami reagującymi na bardzo małe ilości krążących molekuł sekrecją aktywnych związków zmagazynowanych w ziarnistościach. Dlatego PK są często wykorzystywane jako model do badań wyspecjalizowanych komórek sekrecyjnych, chociaż w przeciwieństwie do nich same nie syntetyzują związków znajdujących się w ziarnistościach. Struktury wewnątrzkomórkowe, takie jak: podbłonowy system kanalików okrążających, system kanalików gęstych, pojedyncze mitochondria, ziarna glikogenu będące źródłem energii, nieliczne struktury aparatu Golgiego oraz liczne specyficzne ziarnistości są rozproszone w cytoplazmie PK [37]. Za utrzymanie dyskoidalnego kształtu płytki oraz jego zmiany podczas aktywacji odpowiedzialny jest cytoszkielet płytkowy [22]. Podstawowym składnikiem cytoszkieletu są  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulina, polimery aktyny oraz liczne białka pośredniczące w ich łączeniu [17].

W układzie kanalików gęstych magazynowane są jony wapniowe oraz liczne enzymy, m.in. kierujące przemianami kwasu arachidonowego. Struktury te pełnią istotną rolę w kontroli aktywacji PK [11].

Błona komórkowa składa się z dwóch warstw lipidów: zewnętrznej i wewnętrznej (najliczniejsze są fosfolipidy, a w wewnętrznej warstwie występuje również cholesterol). W błonie rozmieszczone są białka, które mogą przechodzić przez obie warstwy. Wówczas zewnętrzne końce cząstek wiążą się z oligosacharydami i wytwarzają glikoproteiny. Są to receptory dla czynników wpływających na funkcję PK, zawierają kanały jonowe oraz pełnią funkcje enzymów. Powierzchnia błony pokryta jest amorficznym płaszczem – glikokaliksem, który dzięki resztom kwasu sjałowego białek i lipidów ma ujemny ładunek elektryczny [22].

Ziarnistości wewnątrzpłytkowe są miejscem magazynowania wielu składników biologicznie czynnych, które są uwalniane do otaczającego środowiska podczas aktywacji PK [11] (tab. 1).

## AKTYWACJA PŁYTEK KRWI

Aktywacja PK może nastąpić w wyniku adhezji do elementów macierzy pozakomórkowej w miejscu uszkodzenia ściany naczynia krwionośnego, albo też pod wpływem różnorodnych substancji – agonistów (np. trombiny, ADP, tromboksanu  $A_2$ ). W przypadku wysokiego modułu ścinania, który charakteryzuje przepływ krwi w drobnych naczyniach, niezbędnym spoiwem między PK a białkami macierzy



TABELA 1. Składniki ziarnistości wewnątrzpłytkowych [35]

Ziarnistości gęste "czynniki pro-agregacyjne"	$\alpha$ -ziarnistości – "czynniki adhezyjne i naprawcze"	Lizosomy "czynniki oczyszczające"
Nukleotydy Adeninowe: ADP, ATP Guaninowe: GDP, GTP Aminy Serotonina (5-HT) Histamina Jony dwuwartościowe: wapń magnez Fosfoinozytyle	Proteoglikany: <b>Swoiste białka PK:</b> PF4 (czynnik płytkowy 4) $\beta$ TG ( $\beta$ -tromboglobulina); glikoproteiny bogate w serynę <b>Białka adhezyjne:</b> fibronektyna, czynnik von Willebranda, trombospondyna, witronektyna <b>Białka czynne w krzepnięciu krwi i fibrynolizie:</b> fibrynogen, czynniki: V, VII, XI, XII, kininogen, białko S, plazminogen, t-PA <b>Mitogeny:</b> PDGF (czynnik wzrostu pochodzący z płytek), ECGF (cz. wzrostu komórek śródbłonka), IGF (insulinopodobny cz. wzrostu), interleukina $\beta$ <b>Inhibitory proteaz:</b> $\alpha_2$ -makroglobulina, $\alpha_2$ -antytrypsyna, inhibitor kolagenaz, $\alpha_2$ -antypłazmina, PAI-1 (inhibitor aktywatora plazminogenu), C1-inhibitor <b>Białka błony ziarnistości:</b> P-selektyna, białko-33 (GMP-33), GP IIb-IIIa, GP Ib-IX, GP IV (CD36), GP V, CD 9, osteonektyna, Rap I <b>Immunoglobuliny:</b> IgG, IgA, IgM <b>Albuminy</b>	Kwaśne hydrolazy Katepsyna D, E Karboksypeptydazy Kolagenazy Kwaśne fosfatazy Glikohydrolazy

pozakomórkowej jest czynnik von Willebranda. Adhezja PK do struktur podśródbłonkowych, np. kolagenu czy fibronektyny, podobnie jak związanie agonistów z receptorami, uruchamia wewnątrzkomórkowe systemy przesyłania sygnałów aktywujących [19]. Płytki przechodzą wówczas ze stanu spoczynku w stan aktywny, co we wczesnej fazie można stwierdzić obserwując zmianę ich kształtu z dyskooidalnego na nieregularny z licznymi wypustkami. Ten pierwszy, najwcześniejszy etap jest uważany za nieodzowny dla prawidłowego przebiegu procesu aktywacji płytek krwi [2, 32]. Informacja o aktywacji w płytce, która ulega adhezji, może zostać wzmocniona dzięki przyłączeniu cząstek agonistów do receptorów PK. Przesyłane są wówczas dodatkowe sygnały. W PK aktywowanych obserwujemy zmiany metabolizmu, architektury cytoszkieletu, a także translokację białek i aktywację receptorów integrynowych. Umożliwia to ich adhezję, agregację i uwolnienie substancji biologicznie aktywnych ziarnistości, a także udział w retrakcji skrzepu [19].

## ROLA RECEPTORÓW PŁYTKOWYCH W AKTYWACJI PK

Harmonijne funkcjonowanie organizmu oparte jest na nieustannym porozumiewaniu się jego komórek, polegającym na wysyłaniu i odbieraniu różnorodnych informacji. Główną rolę w przypadku PK odgrywają substancje sygnałowe, które nie wnikają do komórek, ale wiążą się z błonowymi receptorami uruchamiając w ten sposób kaskadę

zdarzeń, w wyniku której dochodzi do końcowego efektu biologicznego [28]. W łańcuchu przekazywania sygnału, zainicjowanego przez powierzchniowy receptor biorą udział:

- 1) enzymy efektorowe, tj. cykloaza adenylanowa i guanylanowa, fosfolipaza C, fosfolipaza A, 3-kinaza fosfatydilinozitolowa (PI 3-K), kinazy tyrozynowe białek (PTK) [25];
- 2) wtórne przekaźniki informacji, tzn. cAMP [1], cGMP, DAG, IP,  $Ca^{2+}$ , ikozanoidy;
- 3) efekторы wewnętrzne (enzymy docelowe: kinazy białkowe C, G, A) [37].

Ze względu na budowę i mechanizm działania receptory płytkowe możemy podzielić na dwie grupy: receptory transbłonowe oraz receptory białek adhezyjnych.

Receptory transbłonowe – sprzężone i współpracujące z heterodimerycznymi białkami G – są zbudowane z siedmiu transbłonowych domen tzw. receptorów serpentynowych (metabotropowych). Druga i trzecia pętla oraz C-koniec receptora uważane są za najistotniejsze miejsca oddziaływania białka receptorowego z różnymi rodzajami białek G. Do tej grupy należą receptory dla trombiny, ADP, prostanoidów (TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), fosfolipidów. Również przez te receptory mogą potęgować aktywację PK serotonina i adrenalina, ale same nie są „pełnymi” płytkowymi agonistami [26].

Ostatnio odkryto, że receptor CD47 (IAP – ang. *integrin associated protein*), którego ligandem jest trombospondyna, jest zbudowany z pięciu domen transbłonowych. Mechanizm aktywacji PK z udziałem CD47 nie jest jasny, ale wiadomo, że receptor ten jest sprzężony z heterodimerycznym białkiem G<sub>i</sub> [25].

Niezwykle interesujące są receptory serpentynowe PAR (ang. *proteolytically activated receptor*), połączone z heterodimerycznymi białkami G (G<sub>q</sub>, G<sub>i</sub> i G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>), dla jednego z najsilniejszych płytkowych agonistów – trombiny. Na ludzkich płytkach stwierdzono obecność receptorów PAR-1 wrażliwych tylko na niskie dawki trombiny oraz PAR-4 reagujące na wysokie jej stężenia. Trombina jedynie w formie α stymuluje krwinki płytkowe, m.in. poprzez unikatowy proteolityczny rozpad receptora PAR. W długiej N-końcowej domenie pozakomórkowej receptora znajduje się silnie kwaśna sekwencja, do której przyłącza się trombina, a następnie powoli odcina 41-aminokwasowy odcinek tej zewnątrzkomórkowej domeny. Odślonięty w ten sposób nowy N-koniec receptora pełni rolę agonisty i to on wywołuje odpowiedź PK na trombinę [23, 37].

Ze względu na duże znaczenie adenosynodifosforanu (ADP) w aktywacji PK należałoby wyróżnić wśród tej grupy receptory purynowe. ADP pomimo stosunkowo słabych efektów działania (w porównaniu z innymi agonistami) odgrywa kluczową rolę w prawidłowym przebiegu procesu aktywacji płytek krwi [13]. Jest czynnikiem autokrynnym magazynowanym w wysokich stężeniach w ziarnistościach gęstych płytek krwi i uwalnianym z nich w przebiegu procesu sekrecji zachodzącej pod wpływem innych agonistów [12, 39]. Inhibitory płytkowych receptorów dla ADP są skutecznymi lekami przeciwplatekcyjnymi stosowanymi we wtórnej prewencji epizodów niedokrwienych (Tiklopidyna i Klopidoogrel) [27, 41, 42]. Natomiast u pacjentów ze stwierdzonymi defektami receptorów dla ADP obserwuje się występowanie skaz krwotocznych [4, 5].

Jak dotąd udowodniono istnienie trzech receptorów płytkowych dla ADP. Są to dwa receptory serpentynowe: P2Y<sub>1</sub> [9] i P2T<sub>AC</sub> oraz jeden receptor jonotropowy P2X<sub>1</sub> [7, 18, 20, 46]. ADP po przyłączeniu do receptora P2Y<sub>1</sub> aktywuje fosfolipazę C (PLCβ2/β2) z udziałem heterodimerycznych białek G<sub>q</sub>, powodując hydrolizę 4,5-



bisfosforanu fosfatydyloinozytolu ( $PIP_2$ ) do wtórnych przekaźników informacji: 1,4,5-trisfosforanu inozytolu ( $IP_3$ ) i 1,2-diacyloglicerolu (DAG).  $IP_3$  łączy się ze swoistymi receptorami trisfosfoinozytolowymi (RI), o naturze kanałów wapniowych, obecnymi w błonach systemu kanalików o dużej gęstości. Prowadzi to do uwolnienia jonów wapnia do cytozolu. Uwolniony  $Ca^{2+}$  pobudza receptory rianodinowe (RR), które po aktywacji powodują dalsze uwalnianie  $Ca^{2+}$  z siateczki śródplazmatycznej (narastanie fali wapniowej). Jony wapniowe są następnie wiązane przez kalmodulinę, która fosforyluje liczne białka enzymatyczne powodując ich aktywację (m.in. kinazy białkowe). Natomiast DAG aktywuje białkową kinazę C (PKC), która jest enzymem odpowiedzialnym za przeniesienie fosforanu z ATP na serynę lub treoninę odpowiednich białek w obecności jonów wapnia i fosfatydyloseryny. Prowadzi to ostatecznie do uwolnienia zawartości ziarnistości wewnątrzkomórkowych. Receptor  $P2T_{AC}$  połączony jest z białkiem G, i na skutek jego aktywacji pod wpływem ADP dochodzi do inhibicji cykazy adenylanowej (AC) i zmniejszenia stężenia cAMP.  $P2X1$  jest receptorem jonotropowym, którego pobudzenie wywołuje gwałtowny napływ jonów wapnia z zewnątrz. Ostatnio wykazano, że jego pobudzenie skutkuje zmianą kształtu płytek krwi [38].

Struktura receptorów dla białek adhezyjnych pozwala zaliczyć je do rodzin: integryny, selektyny i immunoglobulin. Do tej grupy należą również GPI-IX i GPIV reagujące odpowiednio z czynnikiem von Willebranda i trombospodyną.

Receptory integrynowe ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_5$ ) są grupą o największym znaczeniu w aktywacji PK, najobficiej w nich występują i są najlepiej poznane.

Integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GP IIB-IIIa) uzyskuje właściwości receptorowe dopiero po aktywacji PK, w wyniku konformacyjnej zmiany cząsteczki. Podstawową rolę  $\alpha_{IIb}\beta_3$  jest udział w procesie agregacji PK zachodzącej pod wpływem wszystkich fizjologicznych agonistów oraz w retrakcji skrzepu. Mechanizm jej działania polega na wiązaniu białek adhezyjnych zawierających sekwencje RGD (Arg-Gly-Asp). Są to: fibrynogen, fibronektyna, witronektyna i czynnik von Willebranda. Integryna ta przyczynia się również do gromadzenia w płytkowych ziarnistościach  $\alpha$  osoczowego fibrynogenu. Fizjologiczne znaczenie integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GP IIB-IIIa) w procesie hemostazy obrazuje skaza krwotoczna spowodowana jej ilościowym bądź jakościowym defektem – trombostenia Glanzmanna. Z drugiej strony inhibitory integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GP IIB-IIIa) znajdują coraz większe zastosowanie w leczeniu przeciwzakrzepowym [41]. Należą do nich monoklonalne przeciwciała, np. 7E3 – ReoPro – abciximab [6] i drobnocząsteczkowe peptydy o działaniu antagonistycznym zawierające sekwencje RDG – Integrelin, Tirofiban, Lamifiban, Xemlofiban i inne [48, 31].

Integryna  $\alpha_V\beta_3$  (GP Ic-IIa) jest obecna w PK, komórkach śródbłonna naczyniowego, komórkach mięśni gładkich, fibroblastach i osteoblastach. Jest receptorem witronektyny, fibrynogenu, czynnika von Willebranda, trombospodyny, osteospodyny i prawdopodobnie kolagenu. Obniżoną jej ilość stwierdzono w trombostenii Glanzmanna.

Integryna  $\alpha_2\beta_1$  (GP Ia-IIa) odpowiada za adhezję PK do kolagenu typu I-VIII, przy czym niezbędny jest tu udział jonów magnezu. Jony wapniowe hamują ten proces. Defekty w działaniu tej integryny objawiają się zazwyczaj jako łagodne skazy krwotoczne (agregacja występuje pod wpływem wszystkich agonistów z wyjątkiem kolagenu).

TABELA 2. Wybrane metody badania aktywacji i reaktywności poszczególnych faz pobudzenia PK (wg [13])

Przejaw aktywacji PK	Metody badania aktywacji i reaktywności
TRANSDUKCJA SYGNAŁU	Fosforylacja/defosforylacja – <i>western blotting</i>
REORGANIZACJA CYTOSZKIELETU	Wiązanie fallicidyny do F-aktyny cytoszkieletu
AKTYWACJA RECEPTORÓW BŁONOWYCH	Spektroskopia EPR Spektrofluorymetria cytometria
ZMIANA KSZTAŁTU	Metoda optyczna
AKTYWNOŚĆ PROKOAGULACYJNA	Zmiana asymetrii lipidowej błon Wiązanie aneksyny V
METABOLIZM AA	Zmiany stężenia tromboksanu-TxB <sub>2</sub>
ADHEZJA	Metody kolorymetryczne i komorowe Analizatory przepływowe typu <i>point-of-care</i> *
REAKCJA UWALNIANIA	Immunoenzymatyczne metody oznaczania białek uwalnianych z ziarnistości $\alpha$ (selektyna P, $\beta$ -tromboglobulina, PF-4, PAI-1 wewnątrzpłytkowy), z ziarnistości gęstych (serotonina) z lizosomów (GP-53) Mobilizacja jonów wapnia (ziarnistości gęste) ATP (lucyferyna – lucyferaza)
AGREGACJA	Metody turbidymetryczne Metoda impedancyjna Acytometria przepływowa Metody ubytkowe Agregometria laserowa
*analizatory przepływowe typu <i>point-of-care</i> są półilościowe, oceniają zarówno proces adhezji, jak i agregacji	

Integryna  $\alpha_3\beta_1$  (GP Ic-IIa) jest receptorem fibronektyny, niezależnym od aktywacji PK, warunkuje też tzw. rozpostarcie PK na powierzchni pokrytej fibronektyną.

Integryna  $\alpha_6\beta_1$  (GP Ic-IIa) jest receptorem lamininy występującym na PK i wielu innych komórkach. Adhezja PK do lamininy jest zależna od obecności jonów magnezu, manganu i kobaltu [31, 48].

## METODY POMIARU AKTYWACJI I REAKTYWNOŚCI PK

Pomiar aktywacji PK pozwala wnioskować o ich pobudzeniu wewnątrzustrojowym, czyli o stanie płytki przed wycieczką krwi. Reaktywność to odpowiedź PK na działanie agonistów lub sił ścinających w warunkach *ex vivo*, określana na podstawie



parametrów aktywacji płytek. Należy zwrócić szczególną uwagę na wyjątkową wrażliwość PK, a co za tym idzie duże ryzyko wystąpienia niepożądanego aktywacji w czasie pobierania i preparatyki krwi [14, 15]. Dlatego tak ważne jest odpowiednie pobranie krwi i właściwy dobór antykoagulantu. Niestety w praktyce nie jest możliwe uzyskanie PK, które nie uległy przynajmniej minimalnej niepożądanego aktywacji w czasie pobierania i przygotowania do właściwego oznaczenia [44].

Ze względu na złożoność procesów aktywacji PK nie istnieje jedno, uniwersalne badanie testujące całkowitą sprawność hemostatyczną PK. Każdą z faz aktywacji PK można badać za pomocą kilku alternatywnych metod (tab. 2) [33, 36].

## PŁYTKA KRWI JAKO KOMÓRKA MODELOWA

Komórki i składniki krwi są szczególnie narażone na kontakt ze wszystkimi substancjami w różny sposób wprowadzanymi do krwioobiegu, nawet tymi szybko metabolizowanymi i wydalnymi [3]. Nowosyntetyzowane związki chemiczne, preparaty otrzymywane z produktów naturalnych [46] czy też nowe analogi znanych leków są przed podjęciem prób klinicznych poddawane wielostopniowej ocenie w badaniach przesiewowych *in vitro* i *in vivo* [30]. Różne strategie badawcze oraz stosowanie w nich różnych modeli doświadczalnych pozwalają na lepsze poznanie biologii procesu chorobowego, co w konsekwencji prowadzi do poszukiwań nowych leków i strategii terapeutycznych [40]. Zgodnie z definicją – „...*model doświadczalny winien być układem możliwie zbliżonym do układu badanego, ale prostszym i łatwiej dostępnym*” [29].

Dzięki swej skomplikowanej strukturze [22] płytka krwi od lat jest wykorzystywana jako komórka modelowa w badaniach farmakologicznych leków [34]. Dzięki temu można zredukować eksperymenty na zwierzętach i hodowlach komórkowych. Dotyczy to nie tylko badań hemostazy, ale poprzez analogie w budowie, także innych komórek, np. neuronów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [24]. Oczywiście między płytką krwi a neuronem istnieją znaczne różnice, ale pewne elementy PK, jak mechanizmy magazynowania i uwalniania serotoniny, receptory płytkowe dla neurotransmiterów (serotoniny, wazopresyny, receptory  $\alpha_2$ - i  $\beta$ -adrenergiczne) oraz obecność niektórych enzymów (np. monoaminooksydazy MAO) pozwalają wykorzystać je do badań przesiewowych leków stosowanych w schorzeniach neurologicznych [10, 38]. Również na komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych i komórkach płytek krwi znajdują się receptory dla tych samych neurotransmiterów. Ich stymulacja wywołuje podobne reakcje w obu typach komórek, tj. zmianę kształtu PK i skurcz mięśni naczyń krwionośnych [43]. W procesach tych pośredniczą takie same przekaźniki – metabolity fosfatydyloinozytoli i jony wapnia [34, 24].

Wielką zaletą płytek krwi jest ich dostępność i to, że w przeciwieństwie do komórek zwierzęcych, często wykorzystywanych w badaniach farmakologicznych, są one reprezentatywne dla człowieka [24].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AKKERMAN JWN. Inhibition of platelet functions by cyclic 3',5'AMP. *Platelets* 1996; 7: 342–344
- [2] BAUER M, MASCHBERGER P, QUEK L i wsp. Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. *Thromb Haemost* 2001; 85: 331–340.
- [3] BLOOM JC: Principles of hematotoxicology: laboratory assessment and interpretation of data. *Toxicol Pathol* 1993; 2: 130–134.
- [4] CATTANEO M, GACHET Ch. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2281–2285.
- [5] CATTANEO M, LECCHI A, LOMBARDI R i wsp. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2<sub>CYC</sub> receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A<sub>2</sub> production and normal granule stores. Further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2<sub>CYC</sub> receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 101–106.
- [6] COLLET JP, MONTALESCOT G, LESTY C i wsp. Disaggregation of *in vitro* preformed platelet-rich clots by abciximab increases fibrin exposure and promotes fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 142–148.
- [7] DANIEL JL, DANGELMAIER C, JIN J i wsp. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 2024–2029.
- [8] DASKALOPOULOU SS, STANSBY G, MIKHAILIDIS DP. Clopidogrel and vascular disease prevention. *Curr Med Res Opi* 2004; 20, 11: 1835–1838.
- [9] ECKLY A, GENDRAULT J-L, HECHLER B i wsp. Differential involvement of the P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>T</sub> receptors in the morphological changes of platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 694–701.
- [10] FERRARESE C, ZOIA C, PECORA N i wsp. Reduced platelet glutamate uptake in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1999; 106: 685–692.
- [11] FOX JEB: Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 198–213.
- [12] GACHET C, HECHLER B, LÉON C i wsp. Purinergic receptors on blood platelets. *Platelets* 1996; 7: 261–267.
- [13] GACHET C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; 86: 222–232.
- [14] GOLĄŃSKI J, WATAŁA C. Instrumentalne metody badania aktywacji i reaktywności płytek krwi – metody typu Point-of-Care. *Diagn Lab*. 2002; 38: 211–222.
- [15] GOLĄŃSKI J, WATAŁA C. Znaczenie procesu aktywacji płytek krwi *in vivo* oraz *in vitro* w wybranych zagadnieniach praktyki klinicznej i diagnostyce laboratoryjnej. *Diagn Lab* 1999; 35: 511–527.
- [16] HARRISON. Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005; 19: 111–123.
- [17] HARTWIG J, ITALIANO J. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1580–1586.
- [18] HOYLAERTS MF, OURY C, TOTZ-ZSAMBOKI E i wsp. ADP receptors in platelet activation and aggregation. *Platelets* 2000; 11: 307–309.
- [19] JANIĄK A, CIERNIEWSKI CS. Wczesne fazy aktywacji płytek. *Acta Haemat Pol* 1997; 28: 15–29.
- [20] JIN J, QUINTON TM, ZHANG J i wsp. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A<sub>2</sub> generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and ADP receptors. *Blood* 2002; 99: 193–198.
- [21] KAMATH S, BLANN AD, LIP GYH. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J* 2001; 22, 17: 1561–1571.
- [22] KOPEĆ M, ŁOPACIUK S. Hemostaza fizjologiczna. [w] Łopaciuk S [red] Zakrzepy i zatory. PZWL, Warszawa 2002: 19–28.
- [23] KOPEĆ M. Różnorodne i zmienne funkcje trombiny. *Acta Haemat Pol* 1997; 28: 95–99
- [24] MANGANO RM, SCHWARCZ R. The human platelet as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate. *J Neurochem* 1981; 36: 1067–1076.
- [25] MAUCO G. Phosphoinositide metabolism. Phosphatidylinositol 3-kinaze. *Platelets* 1996; 7: 341–342.
- [26] MIKKELSEN H. Synergism and autocrine regulation of agonist – inducet platelet responses. *Platelets* 1996; 7: 344–345.
- [27] MULLER C, BUTTNER HJ, PETERSEN J i wsp. A randomized comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after the placement of coronary-artery stents. *Circulation* 2000; 101, 6: 590–594.
- [28] OLAS B. Udział heterodimerycznych białek G w przekazywaniu sygnałów w płytkach krwi. *Acta Haemat Pol* 2001; 32: 393–405.



- [29] OPOLSKI A. Ocena przydatności modeli doświadczalnych w badaniach nad nowymi strategiami terapii przeciwnowotworowej. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Wrocław 2000.
- [30] PARCHMENT RE, GORDON M, GRIESHABER CK i wsp. Predicting hematological toxicity (myelosuppression) of cytotoxic drug therapy from *in vitro* tests. *Ann Oncol* 1998; **9** (4): 357–364.
- [31] PATEL D, VÄÄNÄNEN, JIROUŠKOVÁ M i wsp. Dynamics of GP IIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen *in vitro* revealed by videomicroscopy. *Blood* 2003; **101**: 929–936.
- [32] PAUL BZS, DANIEL JL, KUNAPULI SP. Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change. *J Biol Chem* 1999; **274**: 28293–28300.
- [33] PEERSCHKE EI. The laboratory evaluation of platelet dysfunction. *Clin Lab Med* 2002; **22**: 405–420.
- [34] PLETSCHER A. Platelets as models: Use and limitations. *Experientia* 1988; **44**: 152–155.
- [35] QUINN MJ, FITZGERALD DJ. Ticlopidine and Clopidogrel. *Circulation* 1999; **100**: 1667–1672.
- [36] RAND ML, LEUNG R, PACKHAM MA. Platelet function assays. *Transfus Apheresis Sci* 2003: 307–317.
- [37] RENDU F, BROHARD-BOHN B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; **12**: 261–273.
- [38] ROLF MG, BREARLEY CA, MAHAUT-SMITH MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X<sub>1</sub> purinoceptors with  $\alpha,\beta$ -Methylene ATP. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 303–308.
- [39] SAVAGE B, CATTANEO M, RUGGERI ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol* 2001; **8**: 270–276.
- [40] SILVER H, YOUDIM MB. MAO-A and MAO-B activities in rat striatum, frontal cortex and liver are unaltered after long-term treatment with fluvoxamine and desipramine. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000 Mar; **10**: 125–128.
- [41] TANIUCHI M, KURZ HI, LASALA JM. Randomized comparison of ticlopidine and clopidogrel after intracoronary stent implantation in a broad patient population. *Circulation* 2001; **104**, 5: 539–543.
- [42] URBANO LA, BOGOUSSLAVSKY J. Antiplatelet drugs in ischemic stroke prevention: from monotherapy to combined treatment. *Cerebrovasc Dis* 2004; **17**: 74
- [43] VOGEL GH. Strategies in drug discovery and evaluation. [w] Vogel GH [red] Drug Discovery and evaluation. Pharmacological Assays. Springer-Verlag 2002.
- [44] WATAŁA C, GOLAŃSKI J. Postępy w metodach badania aktywacji płytek krwi – trudności i ograniczenia. *Acta Haematol Pol* 1999, **30**, 117–125.
- [45] WEBER AA, NEUHAUS T, SEUL C i wsp. Biotransformation of glyceryl trinitrate by blood platelets as compared to vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1996; **309**: 209–213.
- [46] WILDE JI, RETZER M, SIESS W i wsp. ADP-induced platelet shape change: an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet preparation. *Platelets* 2000; **11**: 286–295.
- [47] YAZDANPARAST R, MIANABAD I. The effect of the active component of *Dendrostellera lessertii* on the adhesive property of human platelets and HL-60 cells. *Life Sci* 2004; **75**(6): 733–739.
- [48] ZAWILSKA K. Receptory płytek krwi dla białek adhezyjnych i ich anomalie. *Acta Haemat Pol* 1997; **28**: 15–24.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano 27.01.2005 r.

Przyjęto: 04.07.2005 r.

ul. Kniaziewiczza 1/5; szpital im. Wł. Biegańskiego B I prawa; 91-347 Łódź

e-mail: jsikora@forweb.pl





## ZASTOSOWANIE SZCZEPIONEK Z KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH W LECZENIU CHORÓB NOWOTWOROWYCH\*

DENDRITIC CELL VACCINES FOR THE TREATMENT OF NEOPLASTIC DISEASES

Piotr SMOLEWSKI, Olga GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK

Klinika Hematologii Instytutu Medycyny Wewnętrznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*Streszczenie:* Leczenie przeciwnowotworowe polegające na selektywnym pobudzeniu układu odpornościowego do walki z chorobą stało się ostatnio ponownie przedmiotem rosnącego zainteresowania wielu ośrodków klinicznych na świecie. Jedną z bardzo obiecujących strategii immunoterapii jest wykorzystanie szczepionek z komórek dendrytycznych, poddanych uprzedniej ekspozycji na antygeny nowotworowe. Szczepionki takie zastosowano w szeregu wstępnych prób klinicznych, najczęściej u chorych na guzy łite, w tym na czerniaka złośliwego. Szereg doniesień dotyczy także chorób nowotworowych krwi, szczególnie chłoniaków złośliwych oraz szpiczaka mnogiego. W artykule przedstawiono podstawy teoretyczne oraz metody przygotowywania szczepionek z komórek dendrytycznych, a także wyniki przeprowadzonych dotychczas badań klinicznych w poszczególnych rodzajach nowotworów.

*Słowa kluczowe:* komórki dendrytyczne, immunoterapia, szczepionki, choroby nowotworowe, białaczki, chłoniaki.

*Summary:* During the last two decades treatment based on selective stimulation of immune system has become a promising anti-neoplastic strategy, tested in several clinical centers all over the world. Vaccination with dendritic cells previously exposed to tumor antigens seems to be one of the most attractive approaches of immunotherapy. Dendritic cell-based vaccines were tested in many early phase clinical trials in patients with solid tumors, including malignant melanoma. There are also several reports on effectiveness of this therapeutic approach in patients with hematological malignancies, especially malignant lymphomas and multiple myeloma. In this review we summarize theoretical rationale and the ways of preparation of dendritic cell vaccines as well as results of their use in clinical trials with different types of malignancy.

*Key words:* dendritic cells, immunotherapy, vaccines, neoplastic diseases, leukemias, lymphomas.

\*Praca finansowana z grantu Nr 503-106-2 (Uniwersytet Medyczny w Łodzi), oraz sponsorowana przez Centrum Doskonałości w Medycynie Molekularnej, MolMed (grant SPUB Nr 515-02-003).

*Wykaz stosowanych skrótów:* **APC** (*antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen, **BDC** (*blood dendritic cells*) – komórki dendrytyczne krwi obwodowej; **B-NHL** (*B-cell non-Hodgkin's lymphomas*) – chłoniaki nieziarnicze B-komórkowe; **BrdU** – bromodeoksyrydyna; **CLL** (*chronic lymphocytic leukemia*) – przewlekła białaczka limfatyczna; **CML** (*chronic myelogenous leukemia*) – przewlekła białaczka szpikowa; **CR** (*complete remission*) – całkowita remisja; **DC** (*dendritic cells*) – komórki dendrytyczne; **DTH** (*delayed type hypersensitivity*) – reakcja nadwrażliwości typu opóźnionego; **GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów; **HLA** (*human leukocyte antigen*) – antygeny głównego układu zgodności tkankowej; **IAP** (*inhibitor of apoptosis*) – rodzina inhibitorów apoptozy; **ID** (*idiotype*) – białko idiotypowe; **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **KLH** (*keyhole limpet hemocyanin*) – hemocyjanina; **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny kompleks zgodności tkankowej; **MM** (*multiple myeloma*) – szpiczak mnogi; **PAC** (*prostate acid phosphatase*) – kwaśna fosfataza; **PPD** (*proteine purified derivative*) – oczyszczona pochodna białkowa; **PR** (*partial remission*) – częściowa remisja; **PSA** (*prostate specific antigen*) – antygen specyficzny dla raka stercza; **PSMA** (*prostate specific membrane antigen*) – błonowy antygen specyficzny dla raka stercza; **SCF** (*stem cell factor*) – czynnik wielopotencjalnej komórki pnia; **TAA** (*tumor associated antigen*) – antygen związany z nowotworem; **TCR** (*T cell receptor*) – receptor limfocytów T; **TL** (*tall-like receptor*) – receptor TL; **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów; **TSA** (*tumor specific antigen*) – antygen specyficzny dla nowotworu.

## CHARAKTERYSTYKA BIOLOGICZNA KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH

Odpowiedź immunologiczna jest procesem, w którym organizm broni się przed inwazją czynników chorobotwórczych poprzez ich rozpoznanie, neutralizację i eliminację, nie wywołując negatywnych reakcji w organizmie gospodarza. Niezwykle ważna jest zdolność układu immunologicznego do wykrywania i niszczenia komórek nowotworowych polegająca na aktywacji cytotoksycznych limfocytów T [89].

Jednym z podstawowych elementów koordynujących ten złożony proces wydają się być komórki dendrytyczne (*dendritic cells*, DC). DC mają zdolność do inicjowania i kontrolowania odpowiedzi immunologicznej na obce antygeny [21]. Ponadto odgrywają one kluczową rolę w zapobieganiu autoimmunizacji poprzez wytworzenie tolerancji na własne antygeny i stanowią ważne ogniwo pomiędzy wrodzoną (nieswoistą) i nabytą (swoistą) odpowiedzią immunologiczną [8].

DC należą do grupy komórek prezentujących antygen (*antigen presenting cells*, APC), których obecność wykazano w śledzionie, węzłach chłonnych oraz większości narządów nielimfoidalnych [20,44,68]. APC mają zdolność do wychwytywania i przetwarzania antygenów we krwi obwodowej i w tkankach. Po kontakcie z antygenem migrują do okolicznych węzłów chłonnych, gdzie prezentują go spoczynkowym limfocytom [21].

Niedojrzałe DC pochłaniają i przetwarzają antygen jak typowe APC, ale dla wzbudzenia efektywnej odpowiedzi limfocytów muszą one dojrzeć do w pełni aktywowanych DC, odznaczających się wysoką ekspresją kompleksów antygen-białko układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*, MHC) oraz cząsteczek kostymulujących. Fenotyp dojrzałej DC cechuje więc ekspresja antygenów MHC klasy I i II, CD80, CD86, CD83, CD40 oraz CCR7, chemokiny odpowiedzialnej za migrację



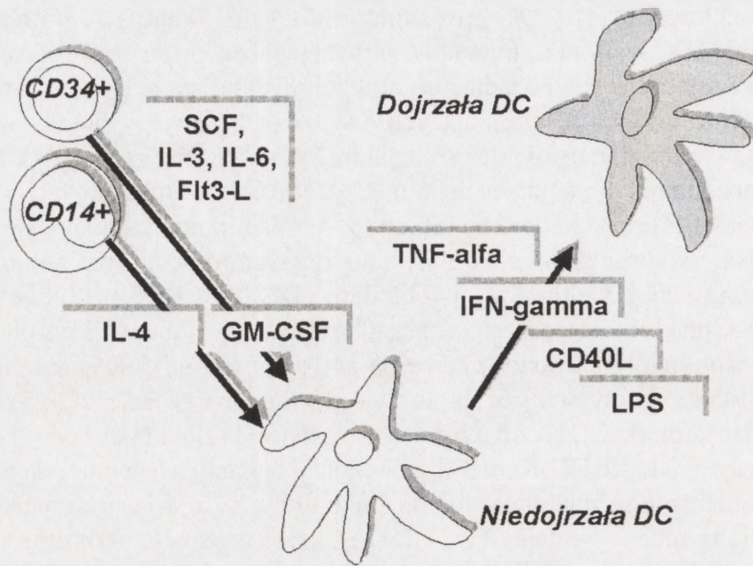
do węzłów chłonnych [15]. DC prezentują limfocytom T antygen w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy I i II. Interakcja antygeny obecnego na cząsteczkach MHC z receptorem limfocytów rozpoznającym antygen (TCR) jest sygnałem, który obok dodatkowych czynników kostymulujących, jest niezbędny do aktywacji komórek T.

Na podstawie zmian morfologicznych, jakim DC podlegają w trakcie wędrówki do węzła chłonnego oraz występujących pomiędzy nimi różnic fenotypowych i czynnościowych, komórki te podzielono na kilka typów. Wśród nich wyróżnia się komórki Langerhansa, śródmiąższowe komórki dendrytyczne, komórki splatające się (*interdigitating cells*), welonowate i folikularne DC (tab. 1) [39]. Różne typy DC można spotkać praktycznie we wszystkich tkankach, w tym również we krwi obwodowej, gdzie w sposób ciągły ekspozowane są na antygeny (*blood dendritic cells*, BDC) [89]. Na podstawie fenotypu wyróżnia się dwie główne subpopulacje DC [25,67,68,89]. Jedną z nich to komórki CD11c<sup>-</sup> o morfologii i ekspresji limfoidalnej, będące prekursorami plazmocytoidalnych DC. Komórki te bez kontaktu z antygenem migrują do węzłów chłonnych, gdzie mogą indukować tolerancję limfocytów na własne antygeny. Drugą subpopulacją to monocytoidalne DC, CD11<sup>+</sup>, które wykazują ekspresję markerów mieloidalnych, dając początek DC oraz makrofagom obecnym w tkankach [67]. Dzięki swoim właściwościom immunostymulującym komórki te znalazły zastosowanie w immunoterapii.

## ZASADY PRZYGOTOWYWANIA SZCZEPIONEK Z KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH

DC, podobnie jak monocyty czy makrofagi, pochodzą z macierzystej komórki szpiku CD34<sup>+</sup>. Odkrycie, że mieloidalne DC można stosunkowo łatwo uzyskać z monocytów lub też z prekursorowych komórek CD34<sup>+</sup>, umożliwiło otrzymanie po raz pierwszy ich większej liczby [46,55,56]. W prawidłowych warunkach DC stanowią bowiem jedynie do 0,2% leukocytów krwi obwodowej. W większości dotychczasowych badań klinicznych stosowano DC pochodzące z monocytów, które hodowane *in vitro* przez 5–7 dni w obecności czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) oraz interleukiny 4 (IL-4) przekształcają się w niedojrzałe DC. Następne dwa dni hodowli w obecności cytokin, między innymi TNF-alfa (*tumor necrosis factor alpha*), umożliwia uzyskanie DC zdolnych do prezentacji antygeny (ryc. 1) [44,69,72].

Rzadziej pozyskuje się DC z komórek macierzystych CD34<sup>+</sup>. Kilkudniowa hodowla w mieszaninie cytokin, takich jak: SCF (*stem cell factor*), IL-3, TNF-alfa oraz ligandu Flt3 (ryc. 1), pozwala na uzyskanie znacznie mniejszej ilości wysoko zróżnicowanych i dojrzałych komórek [2,40]. Wiedza na temat znaczącej roli DC w koordynowaniu reakcji obronnych organizmu oraz indukowaniu specyficznej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym była podstawą do podjęcia prób ich wykorzystania w postaci szczepionek w immunoterapii chorób nowotworowych.



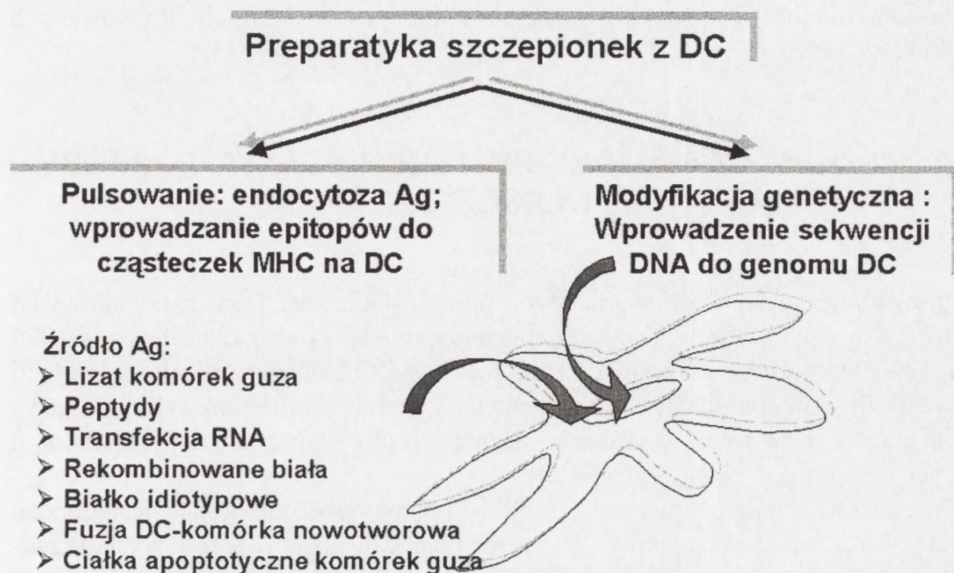
RYCINA 1. Przygotowywanie szczepionek z DC: indukowanie dojrzewania komórek pnia (CD34+) lub monocytów (CD14+) w warunkach *ex vivo*

Większość chorych na choroby nowotworowe wymaga wielokierunkowej terapii, obejmującej często, poza ewentualnym leczeniem chirurgicznym, radio- i/lub chemioterapię. Niestety, są one mało swoiste, niszcząc zarówno chore, jak i zdrowe komórki organizmu, co jest źródłem wielu objawów ubocznych. Poszukiwania możliwie wybiórczej i najmniej obciążającej dla chorego metody leczenia doprowadziły do badań nad alternatywnymi strategiami terapeutycznymi. Jedną z nich jest immunoterapia w różnych jej odmianach, w skład której, obok coraz powszechniej stosowanych przeciwciał monoklonalnych (bierna immunoterapia), wchodzi szczepionki przeciwnowotworowe jako forma immunoterapii aktywnej. Rozpoczęto opracowywanie szczepionek, w których DC zawiera specyficzny dla nowotworu antygen (*tumor specific antigen*, TSA) lub też antygen związany z guzem (*tumor associated antigen*, TAA), obecny także w komórkach zdrowych [10,78]. Po podaniu szczepionki choremu oczekuje się specyficznej odpowiedzi limfocytów T, skierowanej przeciwko określonemu TSA lub TAA [62,91].

Do zdefiniowanych dotychczas TSA należą między innymi PSA (*prostate specific antigen*) w raku stercza oraz chimeryczne białka kodowane przez gen *bcr-abl* w przewlekłej białaczce szpikowej [47,89]. Natomiast onkoproteina p53, której wysoką ekspresję stwierdza się w guzach litych (np. raku piersi) czy białka MAGE-1 w czerniaku lub MUC-1 (*mucin gene 1*) w raku sutka są klasycznymi przykładami znacznie częściej identyfikowanych antygenów związanych z nowotworem, TSA [70,89].

DC staje się efektywną komórką APC po ekspozycji cząsteczek MHC na antygen, z jego następnym wprowadzeniem do wnętrza komórki (tzw. pulsowanie DC; z ang. *pulsing*) (ryc. 2). Najczęściej wykorzystuje się w tym celu inkubację DC z peptydami wiążącymi klasy I i II HLA (*human leukocyte antigen*). Te ostatnie mogą się wbudować





RYCINA 2. Źródło antygenów (Ag) i metody ich wprowadzania do DC

bezpośrednio do cząsteczek MHC na powierzchni komórek lub są wprowadzane endogennie, po proteolitycznym rozkładzie lizatów guza czy rekombinowanych białek pochodzących z komórki nowotworowej [57,70,96]. Ze względu na trudności w identyfikacji i pozyskiwaniu czystych antygenów nowotworowych, w celu stymulacji DC wykorzystuje się także ciała apoptotyczne pochodzące z komórek nowotworowych, eksony, RNA czy transgeny DNA kodującego antygeny guza oraz RNA pochodzące bezpośrednio z tkanek nowotworu [1,13,26,73,80,95]. Inną alternatywą jest tworzenie szczepionek poprzez fuzję DC i komórek nowotworowych [31].

W odróżnieniu od większości immunoterapeutyków podawanych dożylnie szczepionki z DC aplikowane są najczęściej śródskórnym lub nawet bezpośrednio do węzłów chłonnych drenujących obszar nacieku nowotworowego [55]. Okazuje się także, że niedojrzałe DC migrują w mniejszym stopniu niż komórki dojrzałe [27]. Stwierdzono, że po podaniu śródskórnym dociera do węzłów chłonnych mniej niż 5% dojrzałych DC. Pobudzenie aktywności migracyjnej DC może więc podnieść efektywność stosowanej szczepionki. Istotne znaczenie praktyczne może mieć wykazanie stymulującego wpływu cytokin prozapalnych, metaloproteinaz czy ligandów receptora TL (*toll-like receptor*, TLR) dodanych do hodowli DC na ich migrację do węzłów chłonnych [63]. Z drugiej strony, problem migracji można ominąć stosując bezpośrednią iniekcję DC do węzłów chłonnych lub naczyń limfatycznych, co zaburza jedynie architekturę pierwszego węzła.

Ostatnie doniesienia wskazują, że być może najskuteczniejsze okaże się łączenie różnych dróg wprowadzania szczepionek do organizmu. W zależności od lokalizacji guza, podanie dożylnie czy śródskórnym może być bardziej wskazane w nowotworach z przerzutami, na przykład do węzłów chłonnych. Może to zależeć od interakcji pomiędzy

DC a komórkami T w różnych tkankach, a także sposobu migracji aktywowanych limfocytów T [55].

## SZCZEPIONKI Z KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH – PRÓBY KLINICZNE

Próby kliniczne z wykorzystaniem szczepionek z DC prowadzone są od połowy lat dziewięćdziesiątych. Pierwsze doniesienie autorstwa Hsu i wsp. ukazało się w 1996 roku [24]. Dotychczas większość szczepionek z DC używano w celu stymulacji odpowiedzi immunologicznej, w szczególności przeciw komórkom raka [4,45,65]. Najlichniesze, a zarazem najbardziej obiecujące próby kliniczne przeprowadzono u chorych na czerniaka złośliwego [13,89].

Od czasu wspomnianej pierwszej publikacji przeprowadzono kilkadziesiąt badań klinicznych, stosując szczepionki z DC w różnych jednostkach chorobowych. Przedmiotem zainteresowania badaczy byli również pacjenci z rakiem prostaty, nerki, piersi oraz chorzy cierpiący na choroby układu krwiotwórczego, w tym na szpiczaka mnogiego (*multiple myeloma*, MM) i chłoniaki nieziarnicze B-komórkowe (*B-cell non-Hodgkin's lymphoma*, B-NHL).

### Skuteczność szczepionek z komórek dendrytycznych w czerniaku złośliwym

Jak wspomniano, większość badań z wykorzystaniem szczepionek z DC przeprowadzona była dotychczas u chorych na czerniaka złośliwego [6,12,38,49,77,85]. Duże zainteresowanie tym typem nowotworu wynika prawdopodobnie ze stosunkowo dobrze poznanej immunopatologii czerniaka, co daje duże możliwości w wytworzeniu optymalnej szczepionki. Nie bez znaczenia jest również brak innych opcji terapeutycznych możliwych do zaproponowania pacjentom w zaawansowanym stadium tej choroby.

W badaniu opublikowanym w 1998 roku przez Nestle i wsp. [49] wykorzystano szczepionki powstałe przez połączenie niedojrzałych DC pochodzenia monocytoidalnego z lizatem nowotworowym bądź mieszaniną typowych dla czerniaka peptydów (MAGE-1/MAGE3, melana, tyrosinase gp100) oraz hemocyjaniną (*keyhole limpet hemocyanin*, KLH). Po iniekcji dowęzłowej u pacjentów z IV stopniem zaawansowania choroby całkowitą remisję (CR) stwierdzono u dwóch chorych, częściową remisję (PR) u trzech, a u pozostałych 11 z 16 leczonych zaobserwowano dodatnią, antygenowo specyficzną reakcję nadwrażliwości typu opóźnionego (*delayed type hypersensitivity*, DTH). Wyniki te odzwierciedlały stopień korelacji pomiędzy immunologiczną i kliniczną odpowiedzią na leczenie.

Podobne efekty odnotował Banchereau i wsp. [3] (CR - 3/18, PR - 4/18, DTH - 16/18) po śródskórnym podaniu szczepionki z DC pochodzących z komórek macierzystych CD34+, pulsowanych czterema peptydami typowymi dla czerniaka, KLH oraz białkami wirusa grypy – w grupie 18 chorych w zaawansowanym stadium czerniaka. Także w



tym badaniu odnotowano dobrą korelację pomiędzy kliniczną i immunologiczną odpowiedzią na zastosowane leczenie.

O'Rourke i wsp. [52] przeprowadzili podobne badanie w grupie pacjentów z wysokim stopniem zaawansowania choroby podając im szczepionkę z niedojrzałych, monocytoidalnych DC pulsowanych napromienianymi komórkami czerniaka. Trzech spośród 12 chorych osiągnęło trwałą CR, a u trzech kolejnych stwierdzono PR choroby. Zaobserwowano także, że najlepsza odpowiedź na podane leczenie występuje u chorych z mniejszą wyjściową masą guza. Nie odnotowano natomiast wyraźnego związku pomiędzy uzyskaną odpowiedzią a dawką podawanej szczepionki.

Odmienne typy szczepionki w postaci hybrydy DC-komórka nowotworowa zastosowali u pacjentów z czerniakiem Trefzer i wsp. [86]. W grupie 17 poddanych próbie chorych, CR obserwowano u jednego, PR również u jednego, a stabilizację choroby uzyskano u sześciu badanych.

### Szczepionki z komórek dendrytycznych w guzach litych

Szereg badań klinicznych z użyciem szczepionek z DC dotyczy chorych z rakiem gruczołu krokowego. Wynika to w dużej mierze z możliwości identyfikacji w tej chorobie aż trzech antygenów specyficznych dla raka prostaty: PSA (*prostate specific antigen*), PSMA (*prostate specific membrane antigen*) i PAC (*prostate acid phosphatase*). W większości z tych badań wstrzykiwano dożylnie szczepionki powstałe przez połączenie niedojrzałych DC pochodzących z krwi obwodowej (BDC) lub monocytoidalnych DC ze swoistymi antygenami nowotworowymi [5,14,48,76]. Heiser i wsp. [23] podawali śródskórną i dożylną szczepionkę z niedojrzałych monocytoidalnych DC pulsowanych mRNA-PSA u trzech chorych z zaawansowanym rakiem gruczołu krokowego. U wszystkich badanych uzyskano silną odpowiedź limfocytów T, czemu towarzyszyło obniżenie poziomu PSA w surowicy krwi i nieobecność komórek nowotworowych we krwi obwodowej.

Zachęcające wyniki opisano w grupie pacjentów z przerzutowym rakiem nerki po podaniu szczepionki z DC uzyskanej w wyniku fuzji allogenicznych, dojrzałych, monocytoidalnych DC z autologicznymi komórkami nowotworowymi [66]. Spośród 17 badanych chorych, u czterech zaobserwowano CR. Podobne, choć nie tak obiecujące wyniki uzyskano w analogicznych grupach chorych po zastosowaniu dojrzałych monocytoidalnych DC pulsowanych lizatem z komórek nowotworowych (8/12-PD, 4/12 SD, 7/12 DTH) [43].

Próby z zastosowaniem szczepionek z DC przeprowadzono także u chorych na raka piersi [4,29,59]. Przeprowadzone badania oceniały działanie szczepionek z monocytoidalnych DC pulsowanych peptydami nowotworowymi, podawanych śródskórną i dożylną. Próbowano również stosować wstrzykiwane podskórną niedojrzałe monocytoidalne DC połączone z cDNA dla białka MUC1 [4,29]. Tylko w jednym przypadku obserwowano regresję zmian przerzutowych u chorej po podaniu niedojrzałych monocytoidalnych DC pulsowanych lizatem nowotworowym i wstrzykniętych dowęzłowo [29].

Podjęmowane są także próby stosowania omawianego typu immunoterapii w chorobach nowotworowych jelita grubego, przełyku, żołądka oraz trzustki [30,58,60,71], w których pozytywna odpowiedź na zastosowane leczenie obserwowana jest jednak tylko sporadycznie.

### Szczepionki z komórek dendrytycznych w chorobach nowotworowych układu krwiotwórczego

Do osobnej grupy chorób, w stosunku do których prowadzono próby zastosowania DC w celach terapeutycznych, należą nowotwory układu krwiotwórczego.

Szczególnie dobrym celem dla immunoterapii wydają się chorzy na B-NHL oraz MM, u których antygenem spełniającym kryteria TSA jest tak zwanego białko idiotypowe (Id, *idiotype*) obecne w komórkach nowotworowych [11]. Id jest monoklonalną immunoglobuliną zawierającą specyficzne sekwencje białkowe w regionach zmiennych, w miejscach wiążących antygen [32]. W chorobach z klonalną proliferacją komórek B, komórka nowotworowa syntetyzuje pojedynczy typ cząsteczki globuliny z unikalnym zmiennym regionem (Id), który może stymulować specyficzną odpowiedź humoralną i komórkową [33]. Dzięki temu białko Id może być wykorzystane jako cel dla immunoterapii. W trakcie przygotowywania szczepionki, DC uzyskane drogą leukaferezy z krwi obwodowej poddaje się inkubacji *in vitro* z białkiem Id. Szczepionka wykonywana jest indywidualnie dla każdego chorego i podawana drogą dożylną oraz podskórną, dla wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej [42,62,82,83,87].

Jak wspomniano, pierwszą próbą klinicznego zastosowania szczepionki z DC było badanie przeprowadzone przez Hsu i wsp. [24] u czterech pacjentów z chłoniakiem grudkowym. Odpowiedź kliniczną uzyskano u trzech z nich (CR – 2, w tym jedna potwierdzona molekularnie i PR – 1). Po upływie sześciu lat ta sama grupa badaczy opublikowała wyniki stosowania szczepionek z DC u ogółem 35 chorych na B-NHL [82]. U ośmiu chorych stwierdzono specyficzną odpowiedź proliferacyjną limfocytów skierowaną przeciw białku Id. CR uzyskano u trzech chorych, w tym u jednego remisję molekularną, natomiast u czwartego pacjenta obserwowano PR. Inni autorzy uzyskiwali również obiecujące wyniki [10].

Regresję zmian chorobowych obserwowano w skórnych NHL, T-komórkowych [41]. U pięciu z 10 leczonych chorych uzyskano obiektywną odpowiedź kliniczną, w tym u jednego CR utrzymującą się po 19 miesiącach obserwacji. U pozostałych czterech chorych uzyskano PR, w tym u dwóch również trwałą przy medianie obserwacji 10,5 miesiąca.

Interesującą modyfikacją immunoterapii są szczepionki z DC pulsowanych epitopami surwiwiny (*survivin*), białka z rodziny inhibitorów apoptozy (*inhibitor of apoptosis*, IAP). Surwiwina wykazuje ekspresję w komórkach większości typów nowotworów, spełnia więc kryteria TAA [74]. Badanie przeprowadzone na myszach z chłoniakiem B-komórkowym A20 wykazało wysoką skuteczność tych szczepionek w zakresie indukowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej, wskazując na nowe możliwości immunoterapii z użyciem DC [75].



Ze względu na ekspresję białka Id na komórkach szpiczakowych próby zastosowania szczepionek z DC są szczególnie uzasadnione również u chorych na MM [84,88,90]. Potwierdzono to już w 1998 roku, gdy Wen i wsp. [92] zastosowali szczepionkę z monocytoidalnych DC pulsowanych białkiem Id u chorego z zaawansowaną postacią MM, uzyskując znaczący spadek stężenia białka monoklonalnego. Również Lim i wsp. [36] przeprowadzając rok później badanie w grupie sześciu chorych z MM uzyskali specyficzną odpowiedź immunologiczną po podaniu niedojrzałych DC, eksponowanych na antygen Id oraz KHL. Podobnie korzystne efekty obserwowali Liso i wsp. [37]. Nadzieje na zwiększenie efektywności immunoterapii dają ostatnie dane, z których wynika, że hybrydy DC z komórkami szpiczakowymi mogą indukować cytolizę komórek guza w różnych modelach doświadczalnych, włączając w to wcześniejszą modyfikację komórek nowotworowych genami kodującymi IL-4 lub IL-12 [19].

Kolejną chorobą nowotworową układu krwiotwórczego, w której zastosowanie szczepionek z autologicznych DC może otworzyć nowe możliwości terapeutyczne, jest przewlekła białaczka szpikowa (*chronic myelogenous leukemia*, CML) [7,9]. Cechuje się ona bowiem obecnością jednego z dwóch chimerycznych białek kinazy tyrozynowej, będących produktem genu *bcr-abl*. Z uwagi na fakt, że są to białka występujące praktycznie tylko w komórkach białaczkowych, mogą służyć jako TSA dla cytotoksycznych limfocytów T [47]. Pierwsze doniesienie dotyczące próby klinicznego zastosowania szczepionek z DC u pacjentów z CML pochodzi z 1999 roku [16]. U chorego leczonego wcześniej interferonem (IFN)-alfa oraz autotransplantacją szpiku kostnego, po zastosowaniu szczepionki z dojrzałych DC inkubowanych komórkami białaczkowymi Ph<sup>+</sup> oraz białkiem PPD (*protein purified derivative*), obserwowano specyficzną odpowiedź immunologiczną oraz odpowiedź hematologiczną, z uzyskaniem częściowej remisji cytogenetycznej. Inne badania zdają się potwierdzać słuszność stosowania tego typu immunoterapii u pacjentów z CML [8,22,54,93].

Przedmiotem zainteresowania badaczy, próbujących wykorzystać metodę immunoterapii opartą na szczepionkach z DC, są również chorzy z przewlekłą białaczką limfatyczną (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL). Stwierdzono, że DC w CLL mają prawidłową funkcję i mogą służyć jako komórki prezentujące antygen (APC) dla celów immunoterapii [64]. Ponadto, monocyty od chorych na CLL z aktywną chorobą różnicują się do DC, które mają defekty fenotypowe i czynnościowe nieobserwowane u chorych w remisji [53]. Pierwszym jak dotąd doniesieniem przedstawiającym wyniki prób klinicznych z użyciem DC w CLL jest będący aktualnie w druku raport Hus i wsp. [26], którzy podawali szczepionki z autologicznych DC pulsowanych lizatami lub ciałkami apoptotycznymi z komórek białaczkowych u dziewięciu chorych we wczesnym stadium CLL. Autorzy wykazali specyficzną odpowiedź cytotoksycznych limfocytów T na antygen RHAMM/CD168, stanowiący TAA dla komórek CLL, z jednoczesną odpowiedzią hematologiczną w postaci redukcji leukocytozy oraz liczby nowotworowych komórek CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną skuteczność szczepionek z DC u chorych na CLL, przy bardzo dobrej tolerancji tego leczenia. Należy jednak podkreślić, że ze względu na specyfikę CLL ocena rzeczywistych korzyści nowych strategii leczniczych, w tym immunoterapii, wymaga znacznie dłuższych obserwacji niż w przypadku bardziej agresywnie przebiegających chorób układu krwiotwórczego.

Z uwagi na to, że nie wyodrębniono dotąd TSA czy TAA wspólnych dla ostrych białaczek, przygotowanie efektywnych szczepionek z DC dla tych chorych jest niezwykle trudne. Opublikowane dotychczas wyniki prób stosowania immunoterapii w tej grupie chorób wykazują obecność odpowiedzi immunologicznej na szczepienie i dobrą tolerancję kliniczną leczenia, jednak nie potwierdzają znaczącej odpowiedzi hematologicznej, jak na przykład redukcji odsetka komórek białaczkowych w szpiku [17,18,28,34,35].

## **OBJAWY NIEPOŻĄDANE W TRAKCIE LECZENIA SZCZEPIONKAMI Z KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH I OCENA WYNIKÓW LECZENIA**

Immunoterapia z użyciem szczepionek z DC jest na ogół bardzo dobrze tolerowana. Z opisywanych objawów ubocznych najczęstszymi są stany gorączkowe oraz miejscowe reakcje poszczepienne. Ponadto, u około połowy pacjentów z czerniakiem po podaniu szczepionki z DC obserwowano bielactwo wynikające prawdopodobnie z indukowanej w ten sposób immunologicznej destrukcji melanocytów [50]. Są również doniesienia o pojawieniu się miejscowych zmian zapalnych wokół ognisk przerzutowych, co powinno być brane pod uwagę przy rozważaniu możliwości stosowania tego typu terapii u chorych z rozsianą chorobą nowotworową [81]. Najbardziej zastanawiającym, a jednocześnie niezwykle rzadko obserwowanym objawem ubocznym jest rozwój chorób autoimmunologicznych u pacjentów szczepionych DC pulsowanymi pełnymi cząsteczkami antygenów bądź też preparatem otrzymanym z samego guza.

Należy podkreślić, że porównawcza analiza wyników różnych badań klinicznych jest bardzo trudna, ze względu na stosowanie różnorodnych protokołów i technik badawczych, w tym różnych metod oceny skuteczności immunoterapii [13]. Niewątpliwie najbardziej dostępnym materiałem pozwalającym na monitorowanie efektów tego leczenia jest krew obwodowa, w której bada się parametry specyficznej odpowiedzi immunologicznej [51]. Także preparaty otrzymane z bioptatów szpiku kostnego, węzłów chłonnych czy nacieku nowotworowego wydają się być również źródłem wielu cennych informacji [79]. Bardzo istotnym kryterium powinna być ocena efektu klinicznego oparta na jednolitych zasadach.

Jednym ze sposobów oceny odpowiedzi immunologicznej po zastosowaniu szczepionek z DC jest wykrywanie we krwi obwodowej cytokin produkowanych zarówno przez dojrzałe APC, jak i limfocyty Th1 i Th2 [89]. Stosując metodę immunoenzymatyczną ELISPOT bada się między innymi obecność IFN-gamma, TNF-beta, Il-4, Il-10 oraz Il-12. Prowadzono również próby wykrywania autoreaktywnych limfocytów T wykorzystując metodę cytometrii przepływowej oraz bromodeoksyurydyny (BrdU) służącą do oceny proliferacji komórkowej. Innym sposobem monitorowania odpowiedzi immunologicznej u chorych poddanych immunoterapii są badania z wykorzystaniem tetramerów białkowych MHC zarówno do oceny specyficznej odpowiedzi we krwi



obwodowej, jak i w próbkach guza czy węzłów chłonnych mające na celu określenie interakcji cytotoksycznych limfocytów T [94].

Ze względu na wiele stosowanych technik przygotowania szczepionki (różne źródło, metody aktywacji i różnicowania DC), jej podawania oraz monitorowania odpowiedzi immunologicznej i klinicznej, interpretacja i porównanie wyników dotychczasowych doniesień są jednak bardzo utrudnione. Prowadzenie dalszych badań klinicznych z użyciem szczepionek z DC wymaga więc bezwzględnie odpowiedniej standaryzacji.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AVIGAN D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood Rev* 1999; **13**: 51–64.
- [2] BANCHEREAU J, PALUCKA AK, DHODAPKAR M, BURKENHOLDER S, TAQUET N, ROLLAND A, TAQUET S, COQUERY S, WITTKOWSKI KM, BHARDWAJ N, PINEIRO L, STEINMAN R, FAY J. Immune and clinical responses with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001; **61**: 6451–6458.
- [3] BANCHEREAU J, PALUCKA AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 296–306.
- [4] BROSSART P, WIRTHS S, STUHLER G, REICHARDT VL, KANZ L, BRUGGER W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000; **96**: 3102–3108.
- [5] BURCH PA, BREEN JK, BUCKNER JC, GASTINEAU DA, KAUR JA, LAUS RL, PADLEY DJ, PESHWA MV, PITOT HC, RICHARDSON RL, SMITS BJ, SOPAPAN P, STRANG G, VALONE FH, VUK-PAVLOVIC S. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2175–2182.
- [6] CHANG AE, REDMAN, BG, WHITFIELD JR, NICKOLOFF BJ, BRAUN TM, LEE PP, GEIGER JD, MULE JJ. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1021–1032.
- [7] CHOUDHURY A, TOUBERT A, SUTARIA S, CHARRON D, CHAMPLIN RE, CLAXTON DF. Human leukemia-derived dendritic cells: *ex-vivo* development of specific antileukemic cytotoxicity. *Crit Rev Immunol* 1998; **18**: 121–131.
- [8] CLARK GJ, ANGEL N, KATO M, LOPEZ JA, MACDONALD K, VUCKOVIC S, HART DN. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes Infect* 2000; **2**: 257–272.
- [9] CLAXTON DF, MC MANNIS J, CHAMPLIN R, CHOUDHURY A. Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress. *Crit Rev Immunol* 2001; **21**: 147–155.
- [10] DAVIS ID, JEFFORD M, PARENTE P, CEBON J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 3–29.
- [11] DAVIS TA, HS FJ, CASPAR CB, BECKHOVEN A, CZERWINSKI DK, LILES TM, TAIDI B, BENIKE CJ, ENGLEMAN EG, LEVY R. Idiotype vaccination following ABMT can stimulate specific anti-idiotype immune responses in patients with B-cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; **7**: 517–522.
- [12] FARIES MB, CZERNIECKI BJ. Dendritic cells in melanoma immunotherapy. *Curr Treat Options Oncol* 2005; **6**: 175–184.
- [13] FIGDOR CG DE VRIES IJ, LESTERHUIS WJ, MELIEF CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004; **10**: 475–480.
- [14] FONG L, BROCKSTEDT D, BENIKE C, BREEN JK, STRANG G, RUEGG CL, ENGLEMAN EG. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* 2001; **167**: 7150–7156.
- [15] FONG S, ENGLEMAN EG. Dendritic cell in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2000; **18**: 245–273.
- [16] FUJII S, SHIMIZU K, FUJIMOTO K, KIYOKAWA T, SHIMOMURA T, KINOSHITA M, KAWANO F. Analysis of a chronic myelogenous leukemia patient vaccinated with leukemic dendritic cells following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Jpn J Cancer Res* 1999; **90**: 1117–1129.

- [17] FUJII S, SHIMIZU K, FUJIMOTO K, KIYOKAWA T, TSUKAMATO A, SANADA I, KAWANO F. Treatment of posttransplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogenic-dendritic Wells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* 2001; **42**: 357–369.
- [18] GALEA-LAURI J, DARLING D, MUFTI G, HARRISON P, FARZANEH F. Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2002; **51**: 299–310.
- [19] GONG J, KOIDO S, CHEND, TANAKA Y, HUANG L, AVIGAND, ANDERSON K, OHNO T, KUFLE D. Immunization against murine multiple myeloma with fusions of dendritic and plasmacytoma cells is potentiated by interleukin 12. *Blood* 2002; **99**: 2512–2517.
- [20] HART DN, FABRE JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981; **154**: 347–361.
- [21] HART DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; **90**: 3245–3287.
- [22] HE L, FENG , RAYMOND A, KREGER M, ZENG Y, GRANER M, WHITESELL L, KATSANIS E. Dendritic cell-peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2001; **50**: 31–40.
- [23] HEISER A, COLEMAN D, DANNULL J, YANCEY D, MAURICE MA, LALLAS CD, DAHM P, NIEDZWIECKI D, GILBOA E, VIEWEG J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 2002 Feb; **109**: 409–417.
- [24] HSU FJ, BENIKE C, FANONI F, LILES TM, CZERWINSKI D, TAIDIB, ENGELMAN EG, LEVY R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulse dendrite cells. *Nat Med* 1996; **2**: 52–57.
- [25] HUS I, ROLIŃSKI J. Folikularne komórki dendrytyczne – rozwój i funkcja. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 587–599.
- [26] HUS I, ROLINSKI J, TABARKIEWICZ J, WOJAS K, BOJARSKA-JUNAK A, GREINER J, GIANNOPOULOS K, DMOSZYNSKA A, SCHMITT M. Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005, w druku [Epub ahead of print].
- [27] JONULEIT H, GIESECKE-TUETTENBERG A, TUTING T, THURNER-SCHULER B, STUGE TB, PARAGNIK L, KANDEMIR A, LEE PP, SCHULER G, KNOP J, ENK AH. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001; **93**: 243–251.
- [28] KLAMMER M, WATERFALL M, SAMUEL K, TURNER ML, RODDIE PH. Fusion hybrids of dendritic cells and autologous myeloid blasts as a potential cellular vaccine for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005; **129**: 340–349.
- [29] KOBAYASHI T, SHINOHARA H, TOYODA M, IWAMOTO S, TANIGAWA N. Regression of lymph node metastases by immunotherapy using autologous breast tumor-lysate pulsed dendritic cells: report of a case. *Surg Today* 2001; **31**: 513–526.
- [30] KONO K, TAKAHASHI A, SUGAI H, FUJII H, CHOUHDHURY AR, KIESSLING R, MATSUMOTO Y. Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 3394–3400.
- [31] KRAUSE SW, NEUMAN C, SORURI A, MAYER S, PETERS JH, ANDRSON R. The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells. *J Immunother* 2002; **25**: 421–428.
- [32] KWAK LW. Translational development of active immunotherapy for hematologic malignancies. *Semin Oncol* 2003; **30**: 17–22.
- [33] LAURITZSEN GF, WEISS S, DEMBIC Z, BOGEN B. Naive idiotype-specific CD4(+) T cells and immunosurveillance of B-cell tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 5700–5714.
- [34] LEE JJ, KOOK H, PARK MS, NAM JH, CHOI BH, SONG WH, PARK KS, LEE IK, CHUNG IJ, HWANG TJ, KIM HJ. Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysate for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Apheresis* 2004; **19**: 66–70.
- [35] LEE JJ, NAM CE, NAM JH, LEE HC, CHUNG IJ, PARK MS, CHOI BH, SONG WH, LEE IK, PARK KS, KOOK H, HWANG TJ, TAKEI M, TAKAUE Y, KIM HJ. Generation of cytotoxic donor CD8+ T cell against relapsing leukemic cells following allogeneic transplantation by stimulation with leukemic cell- or leukemic lysate pulsed donor cell-derived dendritic cells. *Leuk Res* 2004; **28**: 517–524.



- [36] LIM SH, BAILEY-WOOD R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 1999; **83**: 215–222.
- [37] LISO A, STOCKERL-GOLSTEIN KE, AUFFERMANN-GRETZINGER S, BENIKE CJ, REICHRDT V, VAN BECKHOEN A, RAJAPAKSA R, ENGELMAN EG, BLUME KG, LEVY R. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; **6**: 621–627.
- [38] LUGOVIC L, SITUM M, KOS L. Malignant melanoma-future prospects. *Acta Dermatovenerol Croat* 2005; **13**: 36–43.
- [39] MACDONALD KP, MUNSTER DJ, CLARK GJ, DZIOANEK A, SCHMITZ J, HART DN. Characterization of human blood dendritic cells subsets. *Blood* 2002; **100**: 4512–4420.
- [40] MACKENSEN A, HERBST B, CHEN JL, KOHLER G, NOPPEN C, HERR W, SPAGNOLI GC, CERUNDOLO V, LINDEMANN A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated *in vitro* from CD4(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 2000; **86**: 385–392.
- [41] MAIER T, TUN-KYI A, TASSIS A, JUNGIUS KP, BURG G, DUMMER R, NESTLE FO. Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Blood* 2003; **102**: 2338–2344.
- [42] MANCHES O, PLUMAS J, LUI G, CHAPEROT L, MOLENS JP, SOTTO JJ, BENZA JC, GALILI U. Anti-Gal-mediated targeting of human B lymphoma cells to antigen-presenting cells: a potential method for immunotherapy using autologous tumor cells. *Haematologica* 2005; **90**: 625–634.
- [43] MARTEN A, FLIEGER D, RENOTH S, WEINECK S, ALBERS P, COMPES M, SCHOTTKER B, ZISKE C, ENGELHART S, HANFLAND P, KRIZEK L, FABER C, VON RUECKER A, MULLER S, SAUERBRUCH T, SCHMIDT-WOLF IG. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother* 2002; **51**: 637–644.
- [44] MILLER A, JĘDRZEJCZAK WW. Komórki dendrytyczne w immunoterapii. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 51–68.
- [45] MORISAKI T, MATSUMOTO K, ONISHI H, KUROKI H, BABA E, TASAKI A, KUBO M, NAKAMURA M, INABA S, YAMAGUCHI K, TANAKA M, KATANO M. Dendritic cell-based combined immunotherapy with autologous tumor-pulsed dendritic cell vaccine and activated T cell for cancer patients: rationale, current progress and perspectives. *Hum Cell* 2003; **16**: 175–182.
- [46] MOTTA MR, CASTELLANI S, RIZZI S, CURTI A, GUBINELI F, FOGLI M, FERRI E, CELLINI C, BACCARANI M, LEMOLI RM. Generation of dendritic cells from CD14+ monocytes positively selected by immunomagnetic adsorption for multiple myeloma patients enrolled in a clinical trial of anti-idiotype vaccination. *Br J Haematol* 2003; **121**: 240–250.
- [47] MULLER L, PAWELEC G. Chronic phase CML patients possess T cell capable of recognizing autologous tumour cells. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**: 943–951.
- [48] MURPHY GP, TJOA BA, SIMMONS SJ, ROGERS MK, KENNY GM, JARISCH J. Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate* 2000; **43**: 59–62.
- [49] NESTLE FO, ALJAGIC S, GILLIET M, SUN Y, GRABBE S, DUMMER R, BURG G, SCHADENDORF D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; **4**: 328–332.
- [50] NESTLE FO, BANCHEREAU J, HART D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001; **7**: 761–765.
- [51] OELKE M, KUROKAWA T, HENTRICH I, BEHRINGER D, CERUNDOLO V, LINDEMANN A, MACKENSEN A. Functional characterization of CD8(+) antigen-specific cytotoxic T lymphocytes after enrichment based on cytokine secretion: comparison with the MHC-tetramer technology. *Scand J Immunol* 2000; **52**: 544–549.
- [52] O'ROURKE MG, JOHNSON M, LANAGAN C, SEE J, YANG J, BELL JR, SLATER GJ, KERR BM, CROWE B, PURDIE DM, ELLIOTT SL, ELLEM KA, SCHMIDT CW. Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2003; **52**: 387–395.
- [53] ORSINI E, PASQUALE A, MAGGIO R, CALABRESE E, MAURO FR, GIAMMARTINI E, GUARINI A, FOA R. Phenotypic and functional characterization of monocyte-derived dendritic cells in chronic lymphocyte leukaemia patients: influence of neoplastic CD19 cells *in vivo* and *in vitro*. *Br J Haematol* 2004; **125**: 720–728.
- [54] OSSENKOPPELE GJ, STAM AG, WESTERS TM, DE GRUIJL TD, JANSSEN JJ, VAN DE LOOSDRECHT AA, SCHEPER RJ. Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous *in vitro* cultured leukemic dendritic cells. *Leukemia* 2003; **17**: 1424–1426.

- [55] PACZESNY S, UENO H, FAY J, BANCHEREAU J, PALUCKA AK. Dendritic cell as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**: 439–447.
- [56] PALUCKA KA, TAQUET N, SANCHEZ-CHAPUIS F, GLUCKMAN JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998; **160**: 4587–4895.
- [57] PAWELEC G, ENGEL A, ADIBZADEH M. Prerequisites for the immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1999; **48**: 214–217.
- [58] PECHER G, HARING A, KAISER L, THIEL E. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* 2002; **51**: 669–673.
- [59] PEDERSEN AE, THORN M, GAD M, WALTER MR, JOHNSEN HE, GAARSDAL E, NIKOLAJSSEN K, BUUS S, CLAESSEN MH, SVANE IM. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination. *Scand J Immunol* 2005; **61**:147–156.
- [60] RAINS N, CANNAN RJ, CHEN W, STUBBS RS. Development of a dendritic cell (DC)-based vaccine for patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; **48**: 347–351.
- [61] RAJE N, HIDESHIMA T, DAVIES FE, CHAUHAN D, TREON SP, YOUNG G, TAI YT, AVIGAN D, GONG J, SCHLOSSMAN RL, RICHARDSON P, KUFU DW, ANDERSON KC. Tumor cell/dendritic cell fusions as a vaccination strategy for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; **125**: 343–352.
- [62] REINHARD G, MARTEN A, KISKE SM, FEIL F, BIEBER T, SCHMIDT-WOLF IG. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy. *Br J Cancer* 2002; **86**: 1592–1533.
- [63] REIS E, SOUSA C. Dendritic cells as sensors of injection. *Immunity* 2001; **14**: 495–498.
- [64] REZVANY MR, JEDDI-TEHRANI M, BIBERFELD P, SODERLUND J, MELLSTEDT H, OSTERBORG A, RABBANI H. Dendritic cells in patients with non-progressive B-chronic lymphocytic leukaemia have a normal functional capability but abnormal cytokine pattern. *Br J Haematol* 2001; **115**: 263–271.
- [65] RIDGWAY D. The first 1000 dendritic cell vaccines. *Cancer Invest* 2003; **21**: 873–886.
- [66] RIESER C, RAMONER R, HOLTL L, ROGATSCH H, PAPESH C, STENZL A, BARTSCH G, THURNHER M. Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Int* 1999; **63**:151–159.
- [67] ROBINSON SP, PATTERSON S, ENGLISH N, DAVIES D, KNIGHT SC, REID CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 2769–2778.
- [68] ROLIŃSKI J. Rola komórek dendrytycznych w immunoterapii chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. *Post Nauk Med* 2000; **4**.
- [69] ROMANIN, GRUNER S, BRANG D, KAMPGEN E, LENZ A, TROCKENBACHER B, KONWALINKA G, FRITSCH PO, STEINMAN RM, SCHULER G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; **180**: 83–93.
- [70] ROSSOWSKA J, PATTASZ-PIASECKA. Zastosowanie komórek dendrytycznych w immunoterapii nowotworów – osiągnięcia i perspektywy. *Post Hig Med Dośw* 2003; **57**: 501–518.
- [71] SADANAGA N, NAGASHIMA H, MASHINO K, TAHARA K, YAMAGUCHI H, OHTA M, FUJIE T, TANAKA F, INOUE H, TAKESAKO K, AKIYOSHI T, MORI M. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 2277–2284.
- [72] SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; **179**: 1109–1118.
- [73] SCHEFFER SR, NAVE H, KORANGY F, SCHLOTE K, PABST R, JAFFEE EM, MANNS MP, GRETEN TF. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response *in vivo*. *Int J Cancer* 2003; **103**: 205–211.
- [74] SCHMIDT SM, SCHAG K, MULLER MR, WECK MM, APPEL S, KANZ L, GRUNEBACH F, BROSART P. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* 2003; **102**: 571–576.
- [75] SIEGEL S, WAGNER A, SCHMITZ N, ZEIS M. Induction of antitumor immunity using survivin peptide-pulsed dendritic cells in a murine lymphoma model. *Br J Haematol* 2003; **122**: 911–914.
- [76] SMALL EJ, FRATESI P, REESE DM, STRANG G, LAUS R, PESHWA MV, VALONE FH. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 3894–3903.
- [77] SMITHERS M, O'CONNELL K, MACFADYEN S, CHAMBERS M, GREENWOOD K, BOYCE A, ABDUL-JABBAR I, BARKER K, GRIMMETT K, WALPOLE E, THOMAS R. Clinical response after intradermal immature dendritic cell vaccination in metastatic melanoma is associated with immune response to particulate antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2003; **52**: 41–52.



- [78] STEINMAN RM, POPE M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1519–1526.
- [79] SUN Y, IGLESIAS E, SAMRI A, KAMKAMIDZE G, DECOVILLE T, CARCELAIN G, AUTRAN B. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods* 2003; **272**: 23–34.
- [80] TARTE K, KLEIN B. Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 1999; **13**: 653–663.
- [81] THOMAS R, PADMANABHA J, CHAMBERS M, MCFADYEN S, WALPOLE E, NIELSSEN G, SMITHERS M. Metastatic lesions in the joint associated with acute inflammatory arthritis after dendritic cell immunotherapy for metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2001; **11**: 167–173.
- [82] TIMMERMAN JM, CZERWINSKI DK, DAVIS TA, HSU FJ, BENIKE C, HAO ZM, TAIDI B, RAJAPAKSA R, CASPAR CB, OKADA CY, VAN BECKHOVEN A, LILES TM, ENGLEMAN EG, LEVY R. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002; **99**: 1517–1526.
- [83] TIMMERMAN JM, LEVY R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999; **50**: 507–529.
- [84] TITZER S, CHRISTENSEN O, MANZKE O, TESCH H, WOLF J, EMMERICH B, CARSTEN C, DIEHL V, BOHLEN H. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* 2000; **108**: 805–816.
- [85] TREFZER U, HERBERTH G, WOHLAN K, MILLING A, THIEMANN M, SHARAV T, SPARBIER K, STERRY W, WALDEN P. Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine* 2005; **23**: 2367–2373.
- [86] TREFZER U, HERBERTH G, WOHLAN K, MILLING A, THIEMANN M, SHEREV T, SPARBIER K, STERRY W, WALDEN P. Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. *Int J Cancer* 2004; **110**: 730–740.
- [87] TRENTIN L, PERIN A, SIVIERO M, PIAZZA F, FACCO M, GURRIERI C, GALVAN S, ADAMI F, AGOSTINI C, PIZZOLO G, ZAMBELLO R, SEMENZATO G. B7 costimulatory molecules from malignant cells in patients with b-cell chronic lymphoproliferative disorders trigger t-cell proliferation. *Cancer* 2000; **89**: 1259–1268.
- [88] TURTLE CJ, BROWN RD, JOSHUA DE, HART DN. DC in multiple myeloma immunotherapy. *Cytotherapy* 2004; **6**: 128–137.
- [89] TURTLE CJ, HART DN. Dendritic cells in tumor immunology and immunotherapy. *Curr Drug Targets* 2004; **5**: 17–39.
- [90] VASIR B, BORGES V, WU Z, GROSMAN D, ROSENBLATT J, IRIE M, ANDERSON K, KUFU D, AVIGAN D. Fusion of dendritic cells with multiple myeloma cells results in maturation and enhanced antigen presentation. *Br J Haematol* 2005; **129**: 687–700.
- [91] WALLER EK. Cellular immunotherapy and cancer. *Semin Oncol* 2004; **31** (Suppl 4): 87–90.
- [92] WEN YJ, LING M, BAILEY-WOOD R, LIM SH. IDIOTYPE protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 957.
- [93] WESTERMANN J, KNOP J, KORNER I, RICHTER G, QIN Z, BLANKENSTEIN T, DORKEN B, PEZZUTO A. Bcr/abl+ autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25** (Suppl 2): S46–49.
- [94] WHITESIDE TL, ZHAO Y, TSUKISHIRO T, ELDER EM, GOODING W, BAAR J. Enzyme-linked immunospot, cytokine flow cytometry, and tetramers in the detection of T-cell responses to a dendritic cell-based multi-peptide vaccine in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 641–649.
- [95] ZHANG M, WANG Q, LIU Y, SUN Y, DING G, FU Z, MIN Z, ZHU Y, CAO X. Effective induction of immune tolerance by portal venous infusion with IL-10 gene-modified immature dendritic cells leading to prolongation of allograft survival. *J Mol Med* 2004; **82**: 240–249.
- [96] ZHOU Y, BOSCH ML, SALGALLER ML. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity. *J Immunother* 2002; **25**: 289–303.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 07.07.2005 r.

Przyjęto: 15.07.2005 r.

ul. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź

e-mail: piotr\_smolewski@wp.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, JPG), albo pliki z Corela, wersja 9,0 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. Na zdjęciach konieczne jest umieszczanie podziałki wskazującej powiększenie obiektów, a nie podawanie powiększeń w podpisach, gdyż zdjęcia ulegają zmniejszeniu do formatu B<sub>5</sub>.

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

### Cennik dla Autorów w 2005 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 roczna*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2006 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](mailto: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 2006
dla instytucji (bibliotek) wynosi	150 zł
dla odbiorców indywidualnych	50 zł

### *Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2006*

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](mailto: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.

## OFERTA WYDAWNICZA

Zeszytów naukowych pod nazwą „Postępy Biologii Komórki:

Zeszyty naukowe pn. *Postępy Biologii Komórki* ukazują się od 1974 r. jako kwartalnik.

**Głównym wydawcą i dystrybutorem kwartalnika naukowego jest Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – 01-813 Warszawa ul. Marymoncka 99, tel. 022-8340344, fax 022- 8640834, e-mail [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)**

W „Postęпах Biologii Komórki” publikowane są artykuły omawiające najnowsze osiągnięcia z zakresu biologii komórki. Zeszyty są przeznaczone dla studentów i nauczycieli, pracowników naukowych uczelni i instytutów naukowych. Wydawanie czasopisma jest możliwe dzięki wsparciu finansowemu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji.

**Zapraszamy wszystkich zainteresowanych problematyką naukowo-badawczą prezentowaną w naszym kwartalniku do korzystania z zamówień zbiorowych i indywidualnych, tzn. z prenumeraty rocznej. Istnieje również możliwość zakupu pojedynczych egzemplarzy, również archiwalnych.**

W załączeniu: cennik, warunki zakupu i prenumeraty oraz formularz zamówienia.

### Cennik:

Wyszczególnienie	Cena w PLN
Prenumerata roczna dla jednostek będących osobami prawnymi	150,00
Prenumerata roczna dla osób indywidualnych	50,00
Komplet archiwalny dla jednostek będących osobami prawnymi	100,00
Komplet archiwalny dla osób indywidualnych	30,00
Zakup pojedynczego egz. dla jednostek będących osobami prawnymi	40,00
Zakup pojedynczego egz. osób indywidualnych	20,00



## Warunki otrzymywania czasopisma

- złożenie zamówienia: faxem, pocztą itp.
- jednoczesne dokonanie wpłaty na konto:

**Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Warszawie**  
**Nr konta 20 1240 1053 1111 0000 0440 9533**

- po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

W sytuacji, kiedy wpłata nastąpi w trakcie trwania prenumeraty, wysyłamy wszystkie zeszyty (numery) czasopisma, które ukazały się w okresie objętym prenumeratą.

tu odciąć

---

## ZAMÓWIENIE

.....dnia.....

nazwa i adres zamawiającego

**Fundacja Biologii Komórki  
i Biologii Molekularnej  
ul. Marymoncka 99  
01-813 WARSZAWA**

L. Dz.....

Zamawiam/y .....egz./kmpł ....., „Postępów Biologii Komórki”.

Kwotę .....złotych (słownie złotych .....)

Przekazaliśmy na Wasze konto dnia .....

Nasz NIP.....

Jednocześnie upoważniamy do wystawienia faktury bez potwierdzającego odbiór podpisu odbiorcy.

(pieczęćka imienna i podpis zamawiającego)

---











## 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 przysyłać 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.587 ) 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). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub 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 podawane należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA 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 złożone 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. Na zdjęciach prosimy zamieszczać podziałkę, a nie podawać powiększenia w podpisie w związku z potrzebą zmniejszenia ilustracji. 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	tak nie	tak nie
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	tak nie	tak nie
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	z komputera IBM	tak nie	tak nie

Odpowiadam za całość pracy opisanej w załączonym maszynopisie tak nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. *podpisy wszystkich autorów*

## TREŚĆ – CONTENT

W tym Zeszyście	393
MAJERCZAK J., ŻOŁĄDŹ J. A., DUDA K.: Charakterystyka strukturalna, biochemiczna i funkcjonalna mięśni zewnętrznych gałki ocznej Structural, biochemical and functional characteristic of the extraocular muscles	395
ZABŁOCKA B.: Translokacja białek sygnałowych jako część składowa zjawiska opóźnionej, poniedokrwiennnej śmierci neuronów Translocation of signaling proteins is an element of the delayed postsichemic neuronal cell death	409
CHOŁUJ A., WIEJAK J., WYROBA E.: Roślinne białka dynamino-podobne. wgląd w ewolucję maszynierii podziału mitochondriów i plastydów Plant dynamin-like proteins – insights into the evolution of division machinery of mitochondria and plastids	423
BURY M., NIEMIERKO A.: Proteosomalna degradacja białek komórkowych Proteasome– dependent degradation of cellular proteins	435
WROTEK S., DĄBROWSKA G., TRETYN A.: Czy istnieje roślinny homolog zwierzęcego peptydu natriuretycznego? Does any homolog of the animal anp exist in the plants?	449
SOBIESZCZUK-NOWICKA E., SOLIŃSKA M., LEGOCKA J.: Roślinne transglutaminazy Plant transglutaminases	463
KAMIŃSKI T.: Wpływ opioidów na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych świń; mechanizm działania agonisty opioidowego FK 33-824 The influence of opioids on steroidogenesis in granulosa and theca interna cells from porcine ovarian follicles; the mechanism of action of opioid agonist FK 33-824	477
DEJA E., SIKORA M., TRETYN A.: Sygnatura wapniowa: generowanie i specyfika cytoplazmatycznego sygnału wapniowego Calcium signature: generation and cytoplasmic specificity of calcium signal	495
KORECKA A., KORCZAK-KOWALSKA G.: Rola apoptozy w odpowiedzi na przeszczep allogeniczny: tolerancja i odrzucanie przeszczepu The role of apoptosis in responsiveness to allograft: tolerance and graft rejection	511
ANTOSZ H.: Ekspresja proto-onkogenu BCL-6 w prawidłowych i nowotworowych komórkach B – The proto-oncogene BCL-6 expression in normal and malignant B cells.	521
WYRZYKOWSKA R., DOMAGAŁA A., KURPISZ M.: Czynniki molekularny w rozrodzie; rola i charakterystyka przeciwciał przeciwplemnikowych Molecular factor in reproduction; the role and characteristics of antisperm antibodies	537
WYRZYKOWSKA R., KURPISZ M.: Przeciwciała przeciwjajnikowe – immunologiczny aspekt niepłodności – Antiovarian autoantibodies – immunological aspect of infertility	549
SIKORA J., KOSTKA B.: Struktura i aktywacja płytek krwi oraz ich zastosowanie jako komórek modelowych lood platelets as pharmacological model	561
SMOLEWSKI P., GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK O.: Zastosowanie szczepionek z komórek dendrytycznych w leczeniu chorób nowotworowych Dendritic cell vaccines for the treatment of neoplastic diseases	571
Wskazówki dla Autorów i warunki prenumeraty	587
Oferta wydawnicza	588