

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 32, ISSUE 4/2005
(591–750)

Postępy Biologii Komórki

Advances in Cell Biology

www.pbkom.pl

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 UWr, 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. Chałubińskiego 6a*

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, 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.

@ 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. 13,0. Ark. druk. 10,0. Podpisano do druku i druk ukończono w grudniu 2005.



Dispholidus typhis

Proliferacja komórek

Aktywność metaboliczna
**Cell Proliferation
Reagent WST-1**

Aktywność proliferacyjna
**Cell Proliferation
ELISA, BrdU**

Cytotoksyczność
**Cytotoxicity
Detection Kit (LDH)**

Apoptoza

Apoptoza vs. Nekroza
**Cell Death Detection
ELISA PLUS**

Aktywność kaspazy
**Homogeneous
Caspases Assay,
fluorimetric**

Sprawdź inne produkty do badań apoptozy
i proliferacji komórek

Roche Applied Science
**Zestawy do badań
apoptozy i proliferacji
komórek**

Delikatne zadania...
*...wymagają
precyzyjnych rozwiązań*

Sprawdź w Roche Applied Science świetne rozwiązania do badań apoptozy i proliferacji. Wiele lat doświadczeń stanowi podstawę dla szerokiego zakresu szybkich, niezawodnych zestawów. Nasze najlepsze produkty gwarantują dokładne wyniki, nawet w dużych laboratoriach .



Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdynskie 6 B
01-531 Warszawa
Tel. (22) 481 55 67 Faks (22) 481 55 99

Zestaw - Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Nr kat. 1 774 425 – 96 testów

Nr kat. 1 920 685 – 10 x 96 testów

Typ oznaczenia: Jednostopniowa „kanapka“ ELISA, kolorymetryczny
Zastosowanie: Ilościowy pomiar apoptozy bez znakowania komórek, odróżnianie apoptozy od nekrozy

Próbki: Lizaty komórkowe, supernatanty z hodowli komórkowych, surowica lub osocze

Specyficzność: Specyficzne dla nukleosomów zawierających jedno i dwuniciowe DNA, gatunkowo niespecyficzne

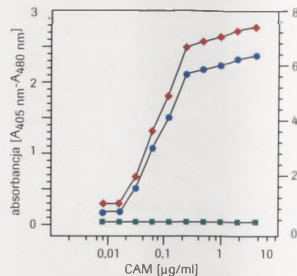
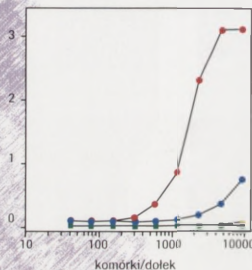
Metoda oznaczenia: Liza komórek, następnie immunochemiczne oznaczenie fragmentów DNA związanych z histonami w płytce (oznaczanie nekrozy poprzez wykrywanie fragmentów DNA związanych z histonami bezpośrednio w supernatancie z hodowli, bez lizy komórek)

Czas pomiaru: 3 godziny

Czułość: < 600 komórek

Rysunek 1: Czułość zestawu Cell Death Detection ELISA^{PLUS} na komórkach U937.

Lizat z CAM (czerwony).
 Lizat bez CAM (niebieski).
 Supernatant z CAM (żółty).
 Supernatant bez CAM (zielony).



Rysunek 2: Eksperyment analizowany z użyciem Cell Death Detection ELISA^{PLUS} na komórkach U937.

Lizat (czerwony). Supernatant (zielony). Czynniki wzbogacający lizat (niebieski).

- określanie poziomu apoptozy względem nekrozy
- wysoka czułość
- łatwość stosowania

Zestaw - In Situ Cell Death Detection Kits

Nr kat. 1 684 809 – 50 testów (AP)

Nr kat. 1 684 795 – 50 testów (Fluoresceina)

Nr kat. 1 684 817 – 50 testów (POD)

Nr kat. 2 156 792 – 50 testów (TMR red)

Typ oznaczenia: Bezpośrednie oznaczenie metodą TUNEL

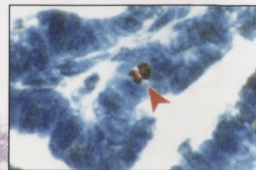
Zastosowanie: Wykrywanie pęknięć nici DNA w komórkach apoptotycznych z zastosowaniem cytometru przepływowego lub mikroskopu fluorescencyjnego

Próbki: Komórki w zawiesinie, komórki przylegające do podłoża, rozmary komórkowe, mrożeniowe lub parafinowe skrawki tkanek

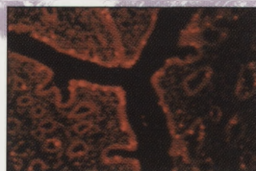
Specyficzność: Ilość pęknięć nici DNA w komórkach apoptotycznych jest tak duża, że stopień wyznakowania komórek pozwala na odróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych

Metoda oznaczenia: Znakowanie końców DNA przy użyciu dUDP związanego fluoresceiną następnie bezpośrednią analizę komórek wyznakowanych fluorescencyjnie

Czas pomiaru: 1 - 3 godzin



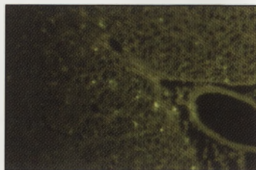
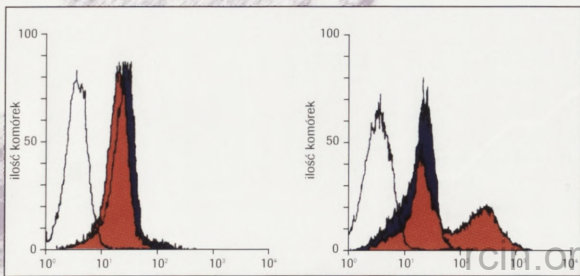
Rysunek 6: Wykrywanie komórek apoptotycznych z użyciem zestawu In Situ Cell Death Detection Kit i znakowane peroksydazą w śródbłonku królika.



Rysunek 5: Śródbłonek królika, barwiony z użyciem In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red

Rysunek 3: Wykrywanie apoptotycznych komórek HL60 z użyciem cytometru przepływowego z zestawem In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein. Mieszanka reakcji TUNEL (niebieski) lub roztwór barwiący (biały) lub PBS dla autofluorescencji (pomarańczowy).

Rysunek 4: Wykrywanie komórek apoptotycznych (zielony) w mikroskopie fluorescencyjnym we fragmencie tkanki z rdzenia kręgowego szczura.



W tym Zeszyście

Ptasie przeciwciała IgY stanowią cenne, alternatywne w stosunku do przeciwciał IgG ssaków narzędzie w badaniach, diagnostyce i terapii. Produkcja ptasich przeciwciał jest prosta i wydajna, gdyż IgY izolowane są z żółtek jaj kurzych. Więcej o tym Czytelnik znajdzie na stronie 597.

Alternatywne składanie RNA jest procesem zwiększającym różnorodność powstających transkryptów RNA i w konsekwencji również białek. Szacuje się, że zjawisko to występuje w około 5–30% ludzkich genów. Więcej o tym Czytelnik może przeczytać na stronie 617.

Rozwijające się kończyny kręgowców są powszechnie wykorzystywanym modelem doświadczalnym do badania mechanizmów różnicowania tkankowego. W związku z tym warto zajrzeć do artykułu pt. „Gra w rękę” na stronie 647.

Powstawanie i mineralizacja zębiny jest dobrze opisana w dwuczęściowym doniesieniu na stronach 661 i 671.

W artykule na stronie 679 zebrano wiadomości na temat kilku powszechnych mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę metylacji DNA. Genetyczne, biochemiczne i cytologiczne badania na ten temat skłaniają do powiązania tego procesu z metylacją histonów, interferencją RNA (RNAi) i modelowaniem struktury chromatyny.

ALEKSANDRA PRZEŁĘCKA **(25.XI.1920–18.09.2005)**

W dniu 18 września 2005 roku zmarła Aleksandra Przełęcka (Lusia), wieloletni pracownik i członek społeczności Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, od lat związana z kwartalnikiem „Postępy Biologii Komórki”. Żyła lat 85. Jej ojcem był Aleksander Napiórkowski, literat, działacz PPS, legionista. Ojciec zginął na wojnie z Rosją Sowiecką w roku 1920. Lusia urodziła się po jego śmierci. Matka Lusi – Wiktoria Alicja Napiórkowska z domu Wysznačka – była nauczycielką, znanym w Łodzi pedagogiem. Tamże Aleksandra Napiórkowska ukończyła w roku 1938 szkołę średnią i rozpoczęła studia na Wydziale Ogrodniczym w Wyższej Szkole Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Podczas okupacji niemieckiej mieszkała w Łodzi i wraz z matką uczestniczyła w tajnym nauczaniu. Od jesieni 1943 r. po styczeń 1945 r. była również moją nauczycielką. Łódź – przemieniona w Litzmannstadt została przez okupantów włączona do Rzeszy Niemieckiej. Na jej obszarze nie było szkół dla dzieci i młodzieży polskiej. Nauczanie po polsku było zabronione. Osobom łamiącym ten zakaz groziło zesłanie do obozu koncentracyjnego.

W nowo otwartym po zakończeniu II wojny światowej Uniwersytecie Łódzkim (24.05.1945) Aleksandra Napiórkowska podjęła studia biologiczne, które zakończyła w 1949 roku. Równoległe ze studiami pracowała od 1945 roku w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin Wydziału Farmacji UŁ (od 1950 r. Akademii Medycznej), w czasie studiów jako laborant, a po ich zakończeniu na stanowisku asystenta. W lipcu 1949 roku wyszła za mąż za Mariana Przełęckiego, wówczas starszego asystenta w Zakładzie Logiki na Uniwersytecie Łódzkim, w latach późniejszych profesora Uniwersytetu Warszawskiego. W 1952 r. Przełęccy przenieśli się z Łodzi do Warszawy. Od września tegoż roku Lusia zaczęła pracować naukowo w stolicy w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Tamże przeszła wszystkie kolejne etapy kariery naukowej, od starszego asystenta do profesora nadzwyczajnego (1974) i profesora zwyczajnego (1988).

W latach 1952–1970 Aleksandra Przełęcka pracowała w Zakładzie Biochemii, którym kierował do roku 1967 prof. Włodzimierz Niemierko. W tym okresie, stosując przede wszystkim metody cytochemiczne, badała procesy przyswajania wosku przez mola woskowego (*Galleria mellonella*) [1, 2]. Wraz ze swym uczniem Andrzejem Dutkowskim opracowała metodę zastosowania autoradiografii do badania lipidów [3].

Stosując tę metodę stwierdziła udział komórek troficznych w syntezie RNA i przekazywanie tych związków do rozwijających się oocytów [4, 5].



W Instytucie Nenckiego z początkiem 1971 r. wprowadzono radykalne zmiany w jego strukturze. W ramach Zakładu Biologii Komórki powstała Pracownia Cytochemii Procesów Wzrostu i Różnicowania. Ówczesnie docent, Aleksandra Przełęcka objęła jej kierownictwo i sprawowała je do końca grudnia 1990 r., to jest do przejścia na emeryturę. Kierownictwo Pracowni przejął wówczas doc. Andrzej Sobota.

W roku 1973 z inicjatywy Aleksandry Przełęckiej i przy jej znaczącym współudziale powstała Pracownia Mikroskopii Elektronowej. Znajdowała się ona w strukturze Instytutu Nenckiego, ale od zarania pełniła jednocześnie funkcję pracowni środowiskowej.

Aleksandra Przełęcka propagowała [6] i sama stosowała techniki transmisyjnej i skaningowej mikroskopii elektronowej oraz mikroanalizy rentgenowskiej [7]. Były one również metodami szeroko wykorzystywanymi przez osoby z Jej Pracowni.

Tematyka badawcza Pracowni Cytochemii Procesów Wzrostu i Różnicowania była zróżnicowana. Prace dotyczące oocytów owadów należały do mniej licznych. Podstawowymi obiektami badawczymi stały się pierwotniaki – orzęski i ameby. Na *Paramecium* badano warstwy powierzchniowe błony (płaszcz) [8], endocytozę oraz ultrastrukturę i aktywność matrycową makronukleusa. U małej ziemnej ameby – *Acanthamoeba castellanii* – analizowano strukturę i mechanizmy powstawania depozytów wapniowych [9, 10].

Aleksandra Przełęcka była promotorem czterech rozpraw doktorskich: Andrzeja Dutkowskiego (1967, wspólnie z Włodzimierzem Niemierką), Wietnamczyka Dai duy Bana (1974), Elżbiety Wyroby (1976) i Wandy Krawczyńskiej-Niewiadomskiej (1977). Dai duy Ban z Jej pomocą uzyskał w Polsce również stopień doktora habilitowanego.

Po powrocie do ojczyzny został dyrektorem instytutu w Hanoi. Elżbieta Wyroba jest profesorem w Instytucie Nenckiego i przewodniczącą Komitetu Cytobiologii PAN.

Aleksandra Przełęcka była osobą obdarzoną wieloma zaletami, ale przede wszystkim była dobrym człowiekiem i takim pozostanie w naszej pamięci.

Leszek Kuźnicki
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PRACE CHARAKTERYZUJĄCE AKTYWNOŚĆ BADAWCZĄ ALEKSANDRY PRZEŁĘCKIEJ

- [1] PRZEŁĘCKA A. Studies on the biochemistry of waxmoth (*Galleria mellonella* L.). Cytochemical study of phospholipids in the intestinal tract of waxmoth larvae. *Acta Biol. Exp. Vars.* 1956; **17**: 231–234.
- [2] PRZEŁĘCKA A. Cytochemical investigation on lipid assimilation by the caterpillar *Galleria mellonella*. *Folia Biol.* Kraków 1963; **11**: 353–417.
- [3] PRZEŁĘCKA A., DUTKOWSKI A. Autoradiographic investigation of incorporation fatty acids into the lipids of insect ovarioles. *Bull. Acad. Pol. Sci. ser. Sci. Biol.* 1965; **13**: 573–575.
- [4] PRZEŁĘCKA A. Incorporation of ^{14}C -sodium palmitate into lipids and cell interaction in ovarioles of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*). *Annals Histochem.* 1966; **11**: 403–411.
- [5] PRZEŁĘCKA A. Developmental changes in the cellular distribution pattern of some dehydrogenases in the ovariole of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*). *Folia Histochem. Cytochem.* 1967; **5**: 27–32.
- [6] PRZEŁĘCKA A. Współczesne metody badania organizacji ultrastrukturalnej komórki. W: Komórka – jej budowa i ruch. Wszechnica PAN, Ossolineum 1987: 9–28.
- [7] PRZEŁĘCKA A., ALLAKHVERDOR B.L., GŁOWACKA S.K., POGARELOV A.Ł. Ultracytochemical localization and microprobe quantitation of calcium stores in the insect oocyte. *Histochemistry* 1978; **67**: 163–175.
- [8] WYROBA E., PRZEŁĘCKA A. Studies on the surface coat of *Paramecium aurelia*. I. Ruthenium red staining and enzyme treatment. *Z. Zellforsch.* 1973; **143**: 343–353.
- [9] SOBOTA A., HREBENDA B., PRZEŁĘCKA A. Formation of calcium-dependent deposits at the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. *Cytobiologie* 1977, **15**: 258–268.
- [10] SOBOTA A., PRZEŁĘCKA A. Developmental changes in the localization of the calcium binding in *Acanthamoeba castellanii*. *Histochemistry* 1981; **71**: 135–144.

PTASIE PRZECIWCIAŁA IgY - ZALETY I ZASTOSOWANIA

AVIAN ANTIBODIES IgY – ADVANTAGES AND APPLICATIONS

Rafał BUKOWSKI, Piotr PODLASZ, Krzysztof WĄSOWICZ

Zespół Anatomii Zwierząt, Katedra Morfologii Funkcjonalnej,
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UWM, Olsztyn

Streszczenie: Ptasie przeciwciała IgY stanowią cenne, alternatywne w stosunku do przeciwciał IgG ssaków narzędzie w badaniach, diagnostyce i terapii. Zalety IgY wynikają z ich różnicy strukturalnej i odległości filogenetycznej od przeciwciał IgG. Ptasie immunoglobuliny są z sukcesem wykorzystywane w testach Western Blot, ELISA, immunoprecypitacji i immunohistochemii. Przeciwciała IgY pozwalają na terapię niektórych chorób bakteryjnych i wirusowych, gdy zawodzi leczenie konwencjonalne. Produkcja ptasich przeciwciał jest prosta, wydajna i mało inwazyjna, gdyż IgY izolowane są z żółtek kurzych jaj. Stosunkowo nieduże zainteresowanie ptasimi przeciwciałami jest wynikiem braku dostatecznej informacji o ich zaletach, technice pozyskiwania i możliwościach zastosowania. Celem tego artykułu jest przedstawienie aktualnej wiedzy o ptasich IgY.

Słowa kluczowe: przeciwciała, ptasie przeciwciała żółtkowe, IgY.

Summary: Chicken egg-yolk antibodies are great, alternative to mammalian IgG, tool in research, diagnostics and therapy. Several advantages of IgY over conventional IgG are due to distinct structural and phylogenetic difference. They are successfully used in immunoassays such as Western Blotting, ELISA, immunoprecipitation, immunohistochemistry and others. Advanced IgY technology enables to treat some bacterial and viral diseases where conventional therapy fails. Production of egg-yolk antibodies, as a minimally invasive method, brings great benefit concerning animal welfare. Egg collection and further isolation of desired antibodies is fast, simple and cost-effective. Lack of information, insufficient experience or simply reluctance to new techniques is the main reason for moderate popularity of IgY. The objective of this paper is to provide information on applications and advantages of chicken IgY.

Keywords: antibodies, chicken egg yolk, IgY, immunoassays.

Jedną z najważniejszych właściwości immunoglobulin jest zdolność wiązania antygeny. Immunoglobuliny od lat zajmują ważne miejsce w badaniach naukowych, diagnostyce i terapii. Stanowią wspaniałe narzędzie pomocne w poznawaniu natury i zwalczaniu chorób.

Najczęściej używanymi przeciwciałami poli- i monoklonalnymi są ssacze immunoglobuliny IgG, które pozostawiają w cieniu nadal niedoceniane, choć znane od dawna ptasie immunoglobuliny IgY. Dotychczasowe badania IgY, oparte w większości na układzie immunologicznym kury domowej (*Gallus domesticus*), zapoczątkował w 1893 r. Klemperer [10], który jako pierwszy opisał u kur procesy przekazywania biernej odporności przeciw toksynie tężcowej. Pomimo tak długiej historii kurze IgY nie są powszechnie wykorzystywane, co może spowodowane jest brakiem informacji o metodach pozyskiwania i możliwych zastosowaniach ptasich przeciwciał. IgY mogą być lepszym narzędziem diagnostycznym, badawczym i terapeutycznym niż konwencjonalne IgG, dzięki swym unikalnym cechom. Dodatkowym czynnikiem przemawiającym na ich korzyść jest sposób otrzymywania, umożliwiający łatwe uzyskanie dużych ilości immunoglobulin, co przekłada się na niższe koszty i tak ważny szczególnie dzisiaj dobrostan zwierząt [21].

Polskojęzyczne prace naukowe dotyczące przeciwciał żółtkowych są rzadkością. Stosunkowo niedawno ukazał się interesujący artykuł przeglądowy o ich strukturze i funkcjach [22]. Nadal jednak liczne możliwe sposoby ich wykorzystywania nie są szeroko znane.

IgY jest głównym przeciwciałem u ptaków, gadów i płazów będącym odpowiednikiem ssaczy IgG. Jest przekazywane z surowicy matki do żółtka jaja decydując o biernej odporności zarodka, a później wyklutego zwierzęcia. Układ odpornościowy ptaków ma również odpowiedniki IgA i IgM, a prawdopodobne istnienie homologów IgE i IgD nie zostało do tej pory dowiedzione. Mimo podobieństw IgY znacznie różnią się budową chemiczną od IgG, albowiem całkowita masa cząsteczkowa przeciwciała kurzego jest większa, wynosi ok 167 kDa (IgG – 160 kDa), masa cząsteczkowa łańcucha ciężkiego wynosi 65 kDa (IgG – 50 kDa), lekkiego zaś – 19 kDa (IgG – 23 kDa). Łańcuch ciężki IgY ma 4 części stałe i 1 zmienną, region zawiasowy zaś jest krótszy i mniej ruchomy niż taki region IgG [6].

Cząsteczka IgY jest bardziej hydrofobowa [4,6], odporna na wahania temperatury i pH w porównaniu z immunoglobulinami G.

Duża odległość filogenetyczna pomiędzy ptakami a ssakami sprawia, że odpowiedź układu odpornościowego kury na silnie konserwatywne (*highly conserved*) antygeny ssaków jest bardzo intensywna [5]. Porównanie właściwości i cech immunoglobulin IgY oraz IgG przedstawiono w tabeli 1.

TERAPIA I PROFILAKTYKA

Zalety IgY wynikające z ich odmiennej struktury wykorzystywane są głównie w immunochemii, w diagnostyce i badaniach naukowych, terapii i profilaktyce. Stosuje się je między innymi w testach ELISA, Western Blot, immunoprecypitacji, immunohistochemii i sortowaniu komórek. W praktyce klinicznej mogą zastępować lub wspierać terapię antybiotykową w niektórych przypadkach, np. lekooporności drobnoustrojów. Znane jest ich skuteczne działanie profilaktyczne przeciwko chorobom bakteryjnym i wirusowym. Trwają intensywne badania nad zastosowaniem IgY w ksenotransplantacji.

TABELA 1. IgY kontra IgG – porównanie

Typ przeciwciał	IgY	IgG
Zwierzę	Ptaki – kura, kaczka	Ssaki – mysz, królik, koza
Źródło izolacji	Żółtko jaja	Surowica
Ilość Ig	Duża	Ograniczona
Izolacja	Prosta, tania, nieinwazyjna	Kosztowna, stresogenna
Układ dopełniacza ssaków	Brak wiązania	Wiązanie
Czynnik reumatoidalny	Brak wiązania	Wiązanie
Receptory Fc	Brak wiązania	Wiązanie
Ig HAMA	Brak wiązania	Wiązanie
Bakteryjne białka A lub G	Brak wiązania	Wiązanie
Antygeny ssaków	Mała homologia, wysoka immunogenność	Wysoka homologia, niższa immunogenność
Aktywność i wartościowość antygenowa – awidność	Wysoka	Średnia

Różnice w budowie fragmentu Fc znacznie redukują tło w reakcjach immunochemicznych, ponieważ nie wiążą się z ssaczym czynnikiem reumatoidalnym RF (*rheumatoid factor*) czy z przeciwciałami HAMA (*human anti-mouse IgG antibodies*) [3]. Czynniki RF, odpowiedzialny za reumatoidalne zapalenie stawów pojawia się również przy innych schorzeniach, a występować może nawet u osobników zdrowych, jest autoprzeciwciałem wiążącym IgG [9]. Coraz powszechniejsze stosowanie, głównie u ludzi, mysich przeciwciał monoklonalnych zwiększa liczbę pacjentów z immunoglobulinami HAMA. W przypadku IgY niedogodności te są wykluczone [12,13].

Ptasie IgY nie aktywują również układu dopełniacza ssaków [13], nie łączą się z receptorami Fc obecnymi na komórkach układu krwionośnego, co podnosi czułość i specyficzność cytometrii przepływową [15]. IgY nie wchodzi w reakcje z białkami bakteryjnymi: gronkowcowym A i paciorkowcowym G, proteinami, które wykazują zdolność wiązania IgG [7].

Przeciwciała ptasie mogą zastępować lub wspomagać konwencjonalne farmaceutyki w leczeniu chorób układu pokarmowego i oddechowego ludzi oraz zwierząt, co jest szczególnie ważne przy wzrastającej liczbie trudnych klinicznie przypadków czy antybiotykooporności drobnoustrojów.

Kurcze przeciwciała podawane doustnie wykazują skuteczność w schorzeniach układu oddechowego o podłożu bakteryjnym czy wirusowym, nie wykazując przy tym żadnych efektów ubocznych. Przeciwwskazaniem jest jedynie alergia pokarmowa na białko kurcze.

Immunoglobuliny, jak wszystkie białka, poddane są procesom denaturacji w przewodzie pokarmowym, ale stwierdzono, że mimo rozpadu na fragmenty Fab i Fc, części Fab nadal mają właściwości wiązania antygeny [1]. Pokrycie IgY polimerami, zamknięcie w liposomach czy zastosowanie związków neutralizujących kwaśne pH znacznie podnosi ich efektywność farmakologiczną [19].

Najlepsze efekty terapeutyczne obserwowano u noworodków, u których pH soku żołądkowego jest prawie obojętne. W grupie cieląt doświadczalnie zakażanych *Salmonella typhimurium* czy *S. dublin*, zwierzęta, którym podawano sproszkowane przeciwciała przeciwko tym patogenom, przeżywały, przy 100% śmiertelności osobników kontrolnych [23]. Podobne efekty uzyskano przy infekcjach bydłowym koronawirusem BCV. Cielęta pozbawione specyficznej, antywirusowej ochrony w postaci IgY skierowanych przeciw BCV padały. Antywirusowe immunoglobuliny IgY zapewniały prawidłowy rozwój i przeżywalność cieląt [8].

Już kilkanaście lat temu uzyskano linie komórkowe produkujące kurze przeciwciała monoklonalne [17]. Zyskały one jednak rozgłos dopiero pod koniec lat dziewięćdziesiątych, kiedy zespół japońskich naukowców uzyskał linie komórkowe produkujące monoklonalne IgY przeciwko ssaczym, bydłowym i ludzkim białkom. Przeciwciała te mogą być wykorzystywane w diagnostyce chorób prionowych [16].

Ksenotransplantacja jest kolejną dziedziną, w której znalazły zastosowanie kurze immunoglobuliny. Podstawą ich wykorzystania w przeszczepach tkanek między gatunkami jest brak zdolności wiązania układu dopełniacza ssaków i fragmentu Fc. Przy przeszczepach pomiędzy świnią domową a człowiekiem znacząco zmniejszają ryzyko odrzutu poprzez blokadę ksenoreaktywnych przeciwciał ludzkich [14].

Surowice przeciwko jadom węży, skorpionów i pajaków, otrzymywane najczęściej z krwi immunizowanych koni, mogą czasami powodować wystąpienie efektów ubocznych – choroby posurowiczej czy szoku anafilaktycznego. Ptasię immunoglobuliny przeciwjadowe eliminują te zagrożenia (z wyjątkiem osobników uczulonych na białko jaja kurzego), przez co mogą być racjonalną alternatywą uzasadnioną większym bezpieczeństwem stosowania i znacznie niższymi kosztami produkcji [20].

Żółtko zawiera średnio 100–400 mg IgY. Kura znosi ok. 20 jaj w miesiącu, co daje 2–3 g czystego IgY miesięcznie, w zależności od metody izolacji. Znane liczne sposoby oczyszczania i frakcjonowania pozwalają na dobór odpowiedniego postępowania w zależności od indywidualnych potrzeb, możliwości finansowych i czasowych. Obok dostępnych komercyjnych zestawów do izolacji IgY można stosować metody z użyciem glikolu polietylenowego (PEG), chloroformu, alkoholu izopropylowego, siarczanu dekstranu lub alginianu sodowego. Powszechnie stosowane są także metody chromatograficzne, frakcjonowanie żelowe czy precypitacja etanolowa [2]. W przeciwieństwie do produkcji przeciwciał u typowych zwierząt laboratoryjnych (najczęściej królik i mysz), nie ma potrzeby skrwawiania – stresogenne są jedynie zabiegi immunizacji. Antygen podawany jest najczęściej w mięsień piersiowy lub podskórnym, przy czym iniekcja domięśniowa daje znacznie silniejszą i bardziej specyficzną odpowiedź immunologiczną. Obok adjuwantu Freund'a stosuje się również inne, np. Hunters Titer Max, Specol itp. Schematy czasowe szczepień zbliżone są do stosowanych rutynowo u

zwierząt laboratoryjnych, z tym że pierwsza immunizacja zalecana jest przed wejściem ptaków w okres nieśności.

Obok typowych antygenów używanych do immunizacji coraz większą popularność zdobywają szczepionki DNA. W wielu przypadkach, kiedy otrzymanie konwencjonalnego antygeny jest bardzo trudne, kosztowne, a czasem wręcz niemożliwe, z pomocą przychodzi biologia molekularna i inżynieria genetyczna [11].

Znajomość sekwencji DNA kodującej określony fragment antygeny lub cały antygen pozwala na skonstruowanie wektora, który będzie ulegał ekspresji w hodowlach bakteryjnych lub komórkach immunizowanych zwierząt. Białka produkowane przez kultury bakteryjne stanowią już typowe antygeny mogące być użyte do immunizacji. Inną możliwość otwierają eukariotyczne wektory pozwalające na ekspresję antygeny w komórkach immunizowanych zwierząt laboratoryjnych. Przeprowadzono udane próby otrzymywania kurzych IgY za pomocą szczepionek DNA [18].

Przedstawiony powyżej szeroki wachlarz możliwych zastosowań kurzych przeciwciał w diagnostyce, terapii i badaniach naukowych, przy relatywnej prostocie i niskich kosztach otrzymywania, powinien skłaniać do ich częstszego stosowania. Odległość filogenetyczna, odmienność strukturalna i wynikające z tego właściwości to kolejne argumenty przemawiające za używaniem ptasich IgY. Nie bez znaczenia jest również fakt, że kurze przeciwciała pozyskuje się w sposób bezkrwawy, oszczędzający cierpień zwierzętom laboratoryjnym.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKITA EM, LI-CHAN EC, NAKAI S. Neutralization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. *Food and Agricultural Immunology* 1998; **10**: 161–172.
- [2] AKITA EM, NAKAI S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods* 1993; **160**: 207–214.
- [3] BOSCATO LM, STUART MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986; **32**: 1491–1495.
- [4] DAVALOS-PANTOJA L, ORTEGA-VINUESA JL, BASTOS-GONZALEZ D, HIDALGO-ALVAREZ R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000; **11**: 657–673.
- [5] GASSMANN M, THOMMES P, WEISER T, HUBSCHER U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J* 1990; **4**: 2528–2532.
- [6] HATTA H, TSUDA K, AKACHI S, KIM M, YAMAMOTO T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; **57**: 450–454.
- [7] HOFFMAN WL, RUGGLES AO, TABARYA D. Chicken anti-protein A prevents *Staphylococcus aureus* protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results. *J Immunol Methods* 1996; **198**: 67–77.
- [8] IKEMORI Y, OHTA M, UMEDA K, ICATLO FC, Jr., KUROKI M, YOKOYAMA H, KODAMA Y. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet Microbiol* 1997; **58**: 105–111.
- [9] JOHNSON PM, FAULK WP. Rheumatoid factor: its nature, specificity, and production in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1976; **6**: 414–430.

- [10] KLEMPERER F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1893.
- [11] KLIMUSZKO D. Szczepionki nowej generacji. *Życie Weterynaryjne* 2002; **77**: 75–77.
- [12] LARSSON A, KARLSSON-PARRA A, SJOQUIST J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* 1991; **37**: 411–414.
- [13] LARSSON A, MELLSTEDT H. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human anti-mouse antibodies in ELISA after *in vivo* treatment with murine monoclonal antibodies. *Hybridoma* 1992; **11**: 33–39.
- [14] LEVENTHAL JR, SU A, KAUFMAN DB, ABECASSIS MI, STUART FP, ANDERSON B, FRYER JP. Altered infectivity of porcine endogenous retrovirus by „protective” avian antibodies: implications for pig-to-human xenotransplantation. *Transplant Proc* 2001; **33**: 690.
- [15] LINDAHL TL, FESTIN R, LARSSON A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: an improved method for studies of platelet activation. *Thromb Haemost* 1992; **68**: 221–225.
- [16] MATSUSHITA K, HORIUCHI H, FURUSAWA S, HORIUCHI M, SHINAGAWA M, MATSUDA H. Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J Vet Med Sci* 1998; **60**: 777–779.
- [17] NISHINAKA S, SUZUKI T, MATSUDA H, MURATA M. A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hybridoma technology. *J Immunol Methods* 1991; **139**: 217–222.
- [18] ROMITO M, VILJOEN GJ, DU PLESSIS DH. Eliciting antigen-specific egg-yolk IgY with naked DNA. *Biotechniques* 2001; **31**: 670–675.
- [19] SHIMIZU M, MIWA Y, HASHIMOTO K, GOTO A. Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; **57**: 1445–1449.
- [20] THALLEY BS, CARROLL SB. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnology* (NY) 1990; **8**: 934–938.
- [21] TINI M, JEWELL UR, CAMENISCH G, CHILOV D, GASSMANN M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; **131**: 569–574.
- [22] TOKARZEWSKI S. Przeciwciała żółtkowe ptaków – struktura i funkcja. *Magazyn Weterynaryjny Suplement – Monografia. Choroby drobiu*. 2004: 52–54.
- [23] YOKOYAMA H, PERALTA RC, UMEDA K, HASHI T, ICATLO FC, Jr., KUROKI M, IKEMORI Y, KODAMA Y. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk Salmonella-specific antibodies. *Am J Vet Res* 1998; **59**: 416–420.

Redaktor prowadzący – Barbara Plytycz

Otrzymano: 14.07.2005 r.

Przyjęto: 01.10.2005 r.

ul. Oczapowskiego 13, 10-719, Olsztyn,

e-mail: r.bukowski@uwm.edu.pl

REGULACJA ŁĄCZNOŚCI SYMPLASTOWEJ W PROCESACH WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN

REGULATION OF SYMPLASTIC CONTINUITY IN PROCESSES OF GROWTH AND DEVELOPMENT IN PLANTS

Katarzyna SOKOŁOWSKA

Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: Zjawiska łączności i izolacji symplastowej są związane z procesem komunikacji międzykomórkowej, w którym istotną rolę pełnią plazmodesmy. Poprzez zmianę stanów konformacyjnych tych struktur możliwa jest albo swobodna wymiana związków niskocząsteczkowych w przypadku otwartych plazmodesm, albo jej całkowite zahamowanie przy ich zamknięciu. Stopień komunikacji międzykomórkowej może być także regulowany poprzez tworzenie nowych plazmodesm oraz likwidację już istniejących. W stanie łączności symplastowej znajdują się komórki pełniące podobne funkcje lub nie-zróznicowane. Natomiast, gdy komórki pełnią odrębne funkcje albo rozpoczynają proces różnicowania, pojawia się izolacja symplastowa. Zjawiska łączności i izolacji symplastowej są powszechne w organizmach roślinnych. Występują w tkankach zarówno merystematycznych, jak i w pełni zróżnicowanych. Umożliwienie komunikacji międzykomórkowej w przypadku łączności symplastowej albo wydzielenie pewnych grup komórek dzięki izolacji reguluje procesy wzrostu i rozwoju oraz zapewnia prawidłowe funkcjonowanie dojrzałych struktur roślinnych.

Słowa kluczowe: plazmodesmy, izolacja symplastowa, łączność symplastowa, komunikacja międzykomórkowa, pole i domena symplastowa.

Summary: Symplastic isolation and symplastic continuity are related to a process of cell-to-cell communication via plasmodesmata. Functional states of plasmodesmata are dynamically changing. Opened plasmodesmata facilitate symplastic transport between cells. Closed plasmodesmata isolate a cell or a group of cells and assure their functional integrity. Cell-to-cell communication may also be regulated due to formation of new plasmodesmata and elimination of existing ones. Symplastic continuity is present between mature cells, which perform the same functions, as well as between cells of undifferentiated structures and organs. The cells performing different functions or beginning a differentiation are symplastically isolated. The phenomenon of symplastic isolation is universal in plant organisms. It has been detected in meristematic tissues and in fully differentiated structures. Symplastic continuity, which makes intercellular communication possible and symplastic isolation, which separates particular groups of cells, both regulate processes of growth and development and guarantee proper functioning of cells in mature plant structures.

Key words: plasmodesmata, symplastic isolation, symplastic continuity, cell-to-cell communication, symplastic domains, symplastic fields.

REGULACJA ŁĄCZNOŚCI SYMPLASTOWEJ W PROCESACH WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN

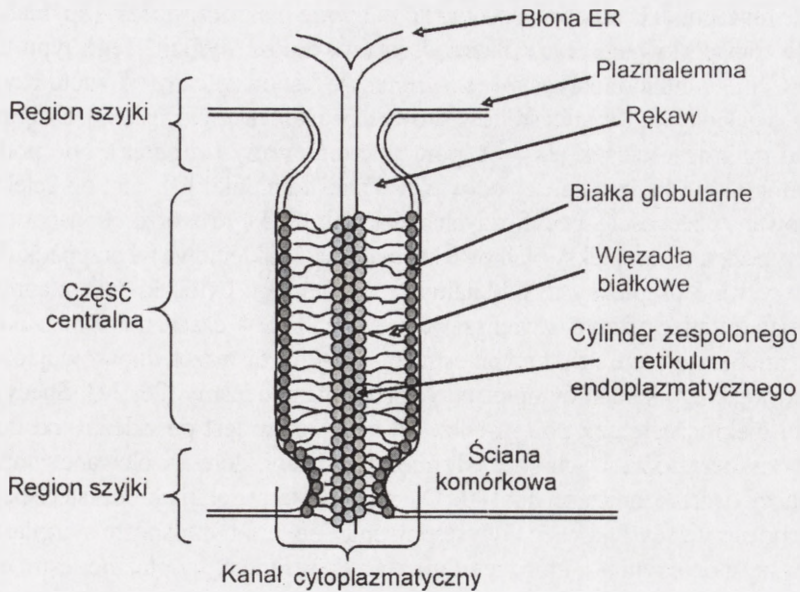
Większość organizmów roślinnych, w tym niektóre glony, mszaki, paprotniki i rośliny nasienne, składa się z dwóch, wzajemnie przenikających się systemów: symplastu i apoplastu. Mianem symplastu określamy system protoplazmy poszczególnych komórek połączony plazmodesmami. Natomiast w skład apoplastu wchodzi pozostałe elementy komórek, czyli system połączonych ścian komórkowych [27].

W obrębie całego organizmu roślinnego symplast nie jest układem ciągłym, ale tworzy mozaikę obszarów izolowanych symplastowo. Obecności ograniczeń w transporcie symplastowym związków niskocząsteczkowych i makrocząsteczek, czyli także o stopniu komunikacji międzykomórkowej zachodzącej w obrębie symplastu, wnioskujemy na podstawie rozprzestrzeniania się symplastowych barwników fluorescencyjnych. Związki te, np. fluoresceina i jej pochodne [5, 6, 19, 28, 30, 41, 47, 54, 60], Lucyfer Yellow [14, 49, 56], HPTS [22, 31, 72] wprowadzone do symplastu są transportowane między komórkami przez plazmodesmy i nie dyfundują do apoplastu. Dzięki temu analiza rozprzestrzeniania się omawianych fluorochromów pozwala określić stopień łączności symplastowej między komórkami, czyli maksymalną masę cząsteczek, jakie mogą być w badanej tkance transportowane przez plazmodesmy. W związku z tym, jeśli między poszczególnymi komórkami transport symplastowych barwników fluorescencyjnych zachodzi swobodnie, komórki te znajdują się w stanie łączności symplastowej. Oznacza to, że molekuly o takiej samej masie jak stosowany znacznik fluorescencyjny lub mniejsze mogą swobodnie dyfundować przez plazmodesmy. Natomiast jeśli transport fluorochromów jest zahamowany, mamy do czynienia ze zjawiskiem izolacji symplastowej [17]. O stopniu łączności symplastowej między komórkami decydują plazmodesmy. Za ich pośrednictwem ciągłość symplastu jest regulowana na dwa sposoby. Po pierwsze następuje modyfikacja stanu konformacyjnego plazmodesm. Po drugie, może zachodzić zmiana liczby plazmodesm występujących między poszczególnymi komórkami. W tym przypadku dochodzi albo do eliminacji istniejących plazmodesm pierwotnych i wtórnych, albo do tworzenia nowych, wtórnych plazmodesm [13]. Zjawiska łączności i izolacji symplastowej decydują o procesie komunikacji międzykomórkowej, a przez to istotnie wpływają na przebieg procesów wzrostu, rozwoju i różnicowania się roślin [34, 46].

1.1. Plazmodesmy – dynamiczne bramki decydujące o łączności symplastowej

Plazmodesmy są wąskimi kanałami cytoplazmatycznymi przenikającymi ścianę komórkową [38, 39, 43, 51, 58, 64, 74]. Stanowią złożony kompleks zbudowany z błon białkowo-lipidowych i białek (ryc. 1).

Kanał cytoplazmatyczny plazmodesmy wyściela plazmalemma, w jego centrum znajduje się cylinder zespolonego retikulum endoplazmatycznego (ER) określane jako desmotubula. Na powierzchni cylindra ER ułożone są białka globularne. Zespolone ER połączone jest z plazmalemmą więzadłami białkowymi, które łączą białka zewnętrznej powierzchni cylindra ER z białkami umieszczonymi na plazmalemmie. Przestrzeń, w której znajdują się więzadła, określana jest mianem rękawa [39, 51]. W



RYCINA 1. Schemat budowy plazmodesmy pierwotnej (wg Lucas i in. [1993], zmienione)

skład plazmodesm wchodzi także elementy cytoszkieletu komórkowego: filamenty aktynowe [71] w połączeniu z miozyną lub białkami podobnymi do miozyny [55] są ułożone helikalnie w rejonie szyjki i wzdłuż całego cylindra ER oraz nanofilamenty centryny obecne jedynie w regionie szyjki [4].

Przez większość plazmodesm swobodnie transportowane są związki o masie cząsteczkowej mniejszej niż 1000 Da [23]. Liczba ta stanowi tzw. wartość graniczną – SEL (*size exclusion limit*). Wartość SEL może się zmieniać i zależy często od gatunku, rodzaju i wieku tkanki oraz organu [7, 17, 23, 29, 45], obecności jonów dwuwartościowych [16], infekcji wirusowej [8, 9, 30, 33, 69, 70], warunków środowiskowych [7], a także od zastosowanych metod badawczych [41, 48, 55, 74].

Plazmodesmy występują w trzech stanach konformacyjnych: otwartym (*open*), zamkniętym (*closed*) i rozszerzonym (*dilated*). Rodzaj stanu konformacyjnego reguluje stopień łączności symplastowej. W stanie zamkniętym nie zachodzi transport symplastowy między komórkami, w związku z tym komórka, której plazmodesmy są zamknięte, jest izolowana symplastowo od komórek sąsiadujących. W stanie konformacyjnym otwartym następuje wymiana związków niskocząsteczkowych, których masa mieści się w granicach SEL. Wówczas komórka znajduje się w stanie łączności symplastowej z komórkami otaczającymi. W stanie rozszerzonym przez plazmodesmy zachodzi transport związków o masie większej niż SEL danej tkanki. Są to na ogół makrocząsteczki, takie jak: wirusowe białka MP [9, 30, 59], czynniki transkrypcyjne [32, 44, 62], białka endogenne [37, 63]. Oczywiście komórki, których plazmodesmy znajdują się w stanie rozszerzonym, są w łączności symplastowej z komórkami sąsiadującymi [74]. Transport makrocząsteczek odgrywa istotną rolę w procesach wzrostu i rozwoju roślin [10, 25, 37,

40]. Może on zachodzić na dwa sposoby. Po pierwsze makrocząsteczki (np. białko GFP) mogą być transportowane przez plazmodesmy w drodze dyfuzji. Tego typu transport określamy jako nieukierunkowany (*non-targeted*). Jest on zależny od wielu czynników, takich jak: wiek tkanki, warunki środowiskowe czy gatunek rośliny [7, 73]. Drugim typem transportu makrocząsteczek jest transport ukierunkowany (*targeted*). Nie podlega on wpływom środowiska, nie zależy od wieku tkanki i gatunku [7]. Jest on selektywny i uwarunkowany obecnością specyficznych białek [10, 38], które tworzą z transportowanymi makrocząsteczkami kompleksy białkowe lub białkowo-nukleinowe (w przypadku kwasów nukleinowych). Kompleksy te oddziałują z elementami cytoszkieletu plazmodesmy rozszerzając średnicę rękawa i zwiększając wartość SEL. W czasie transportu ukierunkowanego zmienia się także struktura przestrzenna makrocząsteczek dopasowując się w ten sposób do wąskiego kanału cytoplazmatycznego plazmodesmy [25, 34]. Specyficzność transportu makrocząsteczek polega także na tym, że nie jest on zależny od transportu związków niskocząsteczkowych. Niekiedy między rejonami, które są izolowane symplastowo, dla substancji o masie mniejszej niż 1000 Da zachodzi transport makrocząsteczek [30, 68].

Plazmodesmy decydują więc o występowaniu lub braku transportu symplastowego, dlatego wszystkie czynniki, które regulują stan konformacyjny plazmodesm, określają także stopień łączności symplastowej komórek. Stan konformacyjny plazmodesm może być regulowany między innymi przez kalozę. Jej synteza i odkładanie się na powierzchni ścian otaczających cylinder ER skutecznie zamyka plazmodesmy. Proces ten jest odwracalny; rozkład kalozy odblokowuje plazmodesmy i przywraca łączność symplastową [39, 55, 56, 61]. Innymi czynnikami wpływającymi na stan konformacyjny plazmodesm są elementy cytoszkieletu [1]. Wskutek kurczenia się filamentów aktynowo-miozynowych w części centralnej plazmodesmy, następuje ich przesunięcie w regionie szyjki, wskutek czego kanał cytoplazmatyczny otwiera się [50]. Stopień otwarcia plazmodesm regulują także skurcze nanofilamentów centryny. Wraz ze wzrostem poziomu wapnia następuje spadek fosforylacji centryn, ich kurczenie, a w konsekwencji zamknięcie plazmodesm [4]. Fragment ściany komórkowej w regionie szyjki plazmodesmy tworzy charakterystyczną strukturę w kształcie pierścienia, określaną jako zwieracz. Przyпуска się, że zwieracz współdziała z filamentami aktynowo-miozynowymi i nanofilamentami centryny regulując stopień otwarcia plazmodesmy [2, 50].

1.2. Pola i domeny symplastowe

Grupy komórek izolowane symplastowo od komórek otaczających tworzą pola i domeny symplastowe. W obszarach tych zachowana jest łączność symplastowa oraz mniej lub bardziej swobodna wymiana takich związków, jak: metabolity, hormony, cząsteczki sygnałowe, wtórne przekaźniki informacji czy jony [11, 39, 67]. Domeny i pola symplastowe stanowią zatem izolowane grupy komórek komunikujących się wzajemnie ze sobą, które funkcjonują w organizmie roślinnym jako odrębne jednostki rozwojowe i fizjologiczne [26].

Pierwszy raz obecność domen symplastowych zaobserwowali Erwee i Goodwin [17]. Ich doświadczenia wykazały, że w organizmie *Egeria densa* istnieje pięć barier transportu symplastowego. Obecne są one w korzeniu (między czapeczką i pozostałymi tkankami

oraz między epidermą i korą pierwotną), w łodydze (między epidermą i korą pierwotną oraz między węzłem i otaczającymi go epidermą i korą pierwotną międzywęźli) oraz u nasady liścia [17]. Późniejsze badania pokazały, że zjawisko regulacji transportu lub całkowitej izolacji symplastowej jest powszechne w organizmach roślinnych. Występuje ono zarówno w tkankach merystematycznych, np. w merystemie apikalnym pędu [21, 48, 56, 57, 67] czy strefie kambium [42], jak i w komórkach w pełni zróżnicowanych, np. epidermie strefy włóknikowej korzenia [11], aparatach szparkowych [17, 52], pasmach floemowych [6, 66] czy podczas rozwoju włókien bawełny [60, 61] lub powstawania brodawek korzeniowych [6].

Z ograniczeniem łączności symplastowej między komórkami i wydzielaniem odrębnych domen symplastowych mamy do czynienia również w regenerujących fragmentach tkanek hodowanych *in vitro*. Między komórkami tytoniu (epidermy i kilku warstw subepidermy umieszczonych w odpowiedniej pożywce) zachowana jest łączność symplastowa, a cały regenerujący się fragment liścia stanowi jedną domenę symplastową. Jednak w momencie wytworzenia wierzchołka, układ ten ulega zaburzeniu, pojawia się izolacja symplastowa, która odgranicza tworzący się wierzchołek od pozostałych komórek, a regenerujący fragment liścia składa się od tej chwili z dwóch domen symplastowych [5].

1.2.1. Pojawienie się izolacji symplastowej jest istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg procesów wzrostu i różnicowania u różnych gatunków roślin

Spadek stopnia łączności symplastowej między komórkami zaobserwowano w rozwijającym się zarodku u *Arabidopsis thaliana* [31] oraz w dojrzewającym woreczku zalążkowym u *Torenia fournieri* [24]. Dzień przed wykształceniem pręcików, między komórkami centralną i jajową woreczka zalążkowego zaobserwowano transport związków o masie do 10 kDa. Świadczy to o dużym stopniu łączności symplastowej. Jednak już następnego dnia przepuszczalność plazmodesm spada, umożliwiając rozprzestrzenianie się związków o masie do 3 kDa. Natomiast dwa dni po wytworzeniu pręcików między komórkami centralną i jajową transportowane są związki o masie mniejszej niż 1 kDa. Jak widać, w miarę dojrzewania woreczka zalążkowego spada przepuszczalność plazmodesm między komórkami centralną i jajową oraz zmniejsza się stopień łączności symplastowej. Następnie, po zapłodnieniu komórki jajowej powstała zygota jest izolowana symplastowo od tworzącego się endospermu [24]. Od tego momentu rozwijający się sporofit jest izolowany symplastowo od otaczającego go gametofitu. Zjawisko izolacji zarodka zaobserwowano także u *Arabidopsis thaliana* [29].

W rozwijającej się plemni u *Chara* sp. między komórkami reprezentującymi różne etapy rozwoju występuje czopowanie plazmodesm łączących komórki przez osmofilny materiał, umożliwiający jednak transport Lucyfer Yellow [36]. Natomiast kiedy komórki nici spermatogenicznych dzielą się lub różnicują synchronicznie, są w stanie swobodnej łączności symplastowej, a w ich plazmodesmach występuje tylko cytoplazma [35]. Prawdopodobnie, czasowa lub permanentna blokada transportu symplastowego, w wyniku zatkania plazmodesm osmofilnym materiałem, umożliwia komórkom powstałym z jednej komórki inicjalnej dzielić się niezależnie bądź realizować odrębne ścieżki rozwojowe [35, 36]. Podobną zależność zaobserwowano między komórkami

siostrzanymi powstałych z protoplastów mikrokallusów u *Solanum nigrum* L. Jeśli komórki siostrzane znajdują się w stanie łączności symplastowej, to dzielą się synchronicznie, pozostając na tym samym etapie rozwoju. Prawdopodobnie rozpoczęcie mitozy w jednej z komórek siostrzanych wywołuje taki sam proces w drugiej komórce siostrzanej. Natomiast asynchroniczność w podziałach komórkowych oraz niezależny czas rozpoczęcia i trwania mitozy, związane często z procesem różnicowania, występują tylko w komórkach izolowanych symplastowo [14]. Można przypuszczać, że regulacja synchronizacji aktywności podziałowej i procesów różnicowania komórek zależy od transportu przez plazmodesmy pewnych cząsteczek sygnałowych. Pojawienie się nawet czasowej izolacji symplastowej komórek hamuje transport cząsteczek sygnałowych, pozwalając izolowanym obszarom na indywidualny rozwój [13]. Selekttywne zamykanie plazmodesm osmofilnym materiałem i wydzielanie w ten sposób rejonów izolowanych symplastowo ma także miejsce w rozwijającym się kallusie u *Molinia caerulea*. Rozwijający się z kallusa proembrion jest izolowany symplastowo od pozostałych komórek kallusa. Również wewnątrz proembrionu znajdują się kilkukomórkowe regiony izolowane symplastowo. Interesujące jest to, że proces zamykania plazmodesm zachodzi w komórkach, które otaczają region izolowany symplastowo, a nie w komórkach, które do niego należą [12].

Zatem zjawisko izolacji symplastowej pojawia się na wczesnych i ściśle określonych etapach rozwoju oraz formowania się określonych struktur i organów roślinnych. Wydaje się, że ograniczenie transportu symplastowego może stanowić istotny czynnik, który wpływa na pojawienie się asynchronicznych podziałów komórkowych i rozpoczęcie określonych procesów różnicowania [12] oraz zapewnia ich prawidłowy przebieg.

W epidermie liści u *Commelina* [15, 17, 52] i *Allium* [52] dojrzałe komórki szparkowe są izolowane symplastowo od siebie oraz od komórek otaczających. Jednak macierzyste komórki szparkowe oraz młode, jeszcze nie w pełni wykształcone szparki znajdują się w łączności symplastowej ze sobą i z komórkami otaczającymi. Dopiero w drugim etapie formowania się kompleksu szparkowego, w momencie, kiedy szparki zaczynają się powiększać, a por jeszcze się nie wykształcił, komórki szparkowe są izolowane symplastowo [52]. Należy także zwrócić uwagę, że izolacja symplastowa komórek szparkowych obserwowana jest w momencie, kiedy w ścianach łączących komórki szparkowe z komórkami otaczającymi występują jeszcze plazmodesmy. W związku z tym obecność izolacji symplastowej nie jest spowodowana zanikiem plazmodesm, ale modyfikacją ich stanu konformacyjnego [52]. Zatem izolacja symplastowa komórek szparkowych pojawia się w trakcie procesu rozwojowego i jest zachowywana niezmiennie w pełni wykształconych strukturach. Podobna sytuacja występuje w korzeniu u *Arabidopsis*. Strefy niezróżnicowane, czyli merystematyczna i wydłużeniowa są połączone symplastowo [11, 28]. Natomiast w momencie, kiedy rozpoczyna się tworzenie włóśników, a więc proces różnicowania, następuje izolacja symplastowa epidermy strefy włóśnikowej od kory pierwotnej oraz epidermy strefy wydłużeniowej [11]. Również w obrębie epidermy dwa typy komórek, czyli trichoblasty i atrichoblasty są izolowane symplastowo od siebie [11]. Jednak mimo że między trichoblastami i atrichoblastami występuje izolacja symplastowa, zachodzi między nimi transport makrocząsteczek. Białko CAPRICE decyduje o wytworzeniu przez komórkę włóśników.

Jego ekspresja zachodzi w atrichoblastach. Następnie jest ono transportowane do trichoblastów (prawdopodobnie przez plazmodesmy), gdzie hamuje transkrypcję genu *GLABRA2*, odpowiedzialnego za fenotyp bezwłosnikowy [68]. Tak jak wspomniano wcześniej, transport makrocząsteczek, a więc także białka CAPRICE, może zachodzić między regionami izolowanymi symplastowo. Jest to możliwe, ponieważ makrocząsteczki oddziałują z cytoszkieletem plazmodesm zwiększając wartość SEL oraz modyfikują swoją strukturę przestrzenną, dopasowując się do wąskiego kanału cytoplazmatycznego [26].

Zjawisko izolacji symplastowej pełni istotną rolę w procesie powstawania kompleksu rurek sitowych i komórek towarzyszących (SE-CC; *sieve elements and companion cells*). Kompleks SE-CC tworzy podłużnie zorientowaną domenę symplastową, którego izolacja pojawia się w trakcie procesu formowania. Na etapie komórek macierzystych zarówno w kierunku osiowym, jak i radialnym występuje łączność symplastowa. Jednak już w momencie zaniku silnej wakuolizacji przyszłych komórek kompleksu pojawia się izolacja w kierunku radialnym. Natomiast podczas różnicowania się komórek towarzyszących i obecności płyt sitowych zostaje dodatkowo zahamowany transport symplastowy w kierunku osiowym. Na tym etapie przyszedł kompleks rurek sitowych i komórek towarzyszących jest izolowany zarówno w kierunku osiowym, jak i radialnym. Dopiero w pełni wykształcony kompleks SE-CC odzyskuje łączność symplastową w kierunku osiowym, zachowując izolację w kierunku radialnym [66]. Należy pamiętać, że zahamowanie transportu symplastowego w kierunku radialnym występuje jedynie w przypadku związków niskocząsteczkowych. Makrocząsteczki, takie jak wirusowe białka MP, są w stanie rozprzestrzenić się z kompleksu SE-CC do komórek otaczających [30]. Jest to kolejny przykład, obok transportu białka CAPRICE [68], rozprzestrzeniania się makrocząsteczek między regionami izolowanymi symplastowo. Zjawisko izolacji symplastowej kompleksu SE-CC zaobserwowano także u *Arabidopsis* [11, 21], *Lupinus luteus* [66], *Zea mays* L. [28] czy w niezainfekowanych korzeniach *Medicago* sp. [6]. Jednak izolacja pasm floemowych może zaniknąć w wyniku infekcji bakteriami z rodzaju *Rhizobium* [6]. Już w pierwszym dniu infekcji korzeni *Medicago truncatula* i *Medicago sativa* między komórkami floemu i kory korzenia zostaje przywrócona łączność symplastowa [6]. W tym samym czasie komórki inicjalne przyszłej brodawki korzeniowej, powstałe z odróżnicowanych komórek endodermy, kory i perycyklu, izolują się symplastowo od pozostałych komórek kory korzenia [6] tworząc pole symplastowe. Interesujący jest mechanizm rozszerzania się granic tego pola. Komórki znajdujące się poza jego obrębem, ale które mają być do niego włączone, najpierw zostają odizolowane symplastowo od komórek kory korzenia. Następnie zachodzą w nich odróżnicujące podziały komórkowe, które prowadzą do powiększenia objętości brodawki. Wyraźnie widać, że zanim komórki ulegną odróżnicowaniu, musi zaistnieć, dzięki zwiększeniu przepuszczalności plazmodesm między określonymi komórkami i izolacji symplastowej między innymi, swoisty proces regulacji komunikacji plazmodesmowej [6].

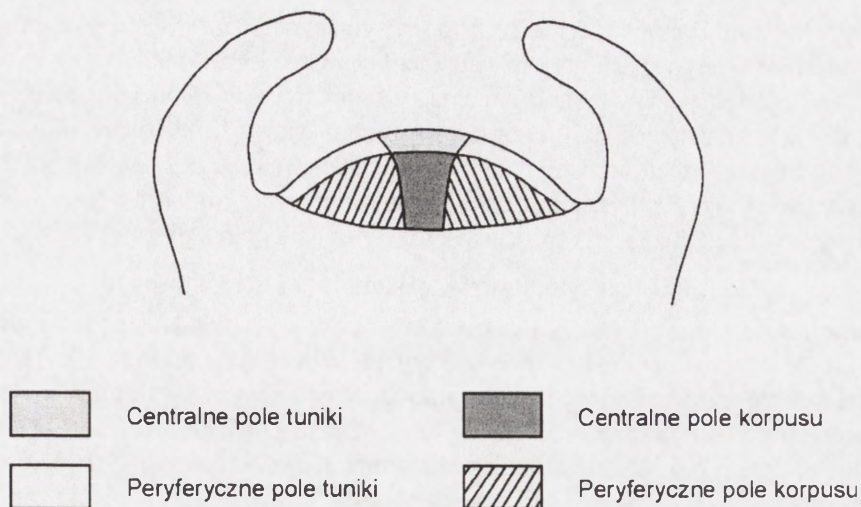
Powyższe przykłady ukazują, że regulacja łączności symplastowej stanowi powszechny mechanizm, który kontroluje oraz koordynuje procesy wzrostu i różnicowania u roślin. Zamknięcie plazmodesm ogranicza nie tylko ruch cząsteczek sygnałowych, jonów czy fotoasymilatów, ale wpływa także na potencjał turgorowy [58]. Zmiany potencjału turgorowego, współdziałając ze zmianami ekspresji transporterów K^+ ,

sacharozy i ekspansyn, uczestniczą w złożonym procesie rozwoju włókien bawełny [60, 61]. Każde włókno bawełny stanowi pojedynczą komórkę, która podczas swojego rozwoju wydłuża się ponad 2000-krotnie. Proces ten można podzielić na trzy fazy. W pierwszej fazie wydłużanie włókien jest powolne. Plazmodesmy łączące komórkę włókna z okrywą nasienną są otwarte. Zachodzi maksymalna ekspresja ekspansyn, dzięki czemu struktura ściany komórkowej ulega rozluźnieniu. W drugiej fazie następuje intensywne wydłużanie włókien bawełny. Jest to możliwe dzięki współdziałaniu dwóch procesów. Po pierwsze rozwijające się włókno zostaje odizolowane symplastowo od komórek okrywy nasiennej w wyniku zamknięcia plazmodesm (poprzez odłożenie kalozy w regionie szyjki plazmodesmy). Po drugie maksymalna ekspresja transporterów K^+ oraz sacharozy powoduje wzrost stężenia substancji osmotycznie czynnych i transport wody do komórek włókien bawełny, co generuje w ten sposób wysoki turgor. Duże ciśnienie turgorowe, dzięki izolacji symplastowej, jest utrzymywane przez kilka dni, umożliwiając intensywne wzrost wydłużeniowy włókien. W ostatniej fazie wskutek degradacji kalozy [61] następuje otwarcie plazmodesm i spadek turgoru włókien. W związku z tym, wydłużanie komórek ulega wyraźnemu zahamowaniu lub zanika zupełnie. Ekspresja ekspansyn oraz transporterów K^+ i sacharozy jest minimalna, a struktura ściany komórkowej ulega zacieśnieniu. Proces rozwoju włókien bawełny zostaje zakończony [60, 61]. Opisany mechanizm świetnie obrazuje, jak duże znaczenie dla rozwoju niektórych struktur roślinnych może pełnić czasowo istniejąca izolacja symplastowa komórek [53, 60]. Im dłużej włókna bawełny w trakcie swojego rozwoju będą izolowane symplastowo, tym będą dłuższe. U gatunków, u których plazmodesmy są przez cały czas otwarte, wydłużanie włókien jest nieznaczne i zachodzi dzięki ekspresji ekspansyn oraz rozluźnieniu ściany komórkowej [61].

1.2.2. Czasowe i przestrzenne zmiany w układzie pól symplastowych merystemu apikalnego pędu

W wyniku analizy rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych barwników symplastowych w merystemach apikalnych pędu u *Arabidopsis* [21, 22], *Betula pubescens* [56, 57] oraz *Sinapis alba* [48] powstał model rozmieszczenia pól symplastowych w merystemie apikalnym pędu roślin okrytozalążkowych (ryc. 2), w którym wyróżniamy: centralne pole tuniki, centralne pole korpusu, peryferyczne pole tuniki oraz peryferyczne pole korpusu [20, 67]. Każde z tych pól pełni inną funkcję. Centralne pole tuniki, poprzez podziały antyklinalne, powoduje wzrost powierzchniowy merystemu. Centralne pole korpusu, przez podziały we wszystkich płaszczyznach, prowadzi do wzrostu objętości trzonu merystemu. Natomiast peryferyczne pola tuniki i korpusu stanowią strefę organogeniczną [67].

Dzięki wprowadzeniu barwników fluorescencyjnych do komórek centralnego i peryferycznego pola tuniki za pomocą techniki mikroiniekcji oraz obserwacji ich rozprzestrzeniania się w symplacie udowodniono, że pola symplastowe merystemu apikalnego podlegają czasowym zmianom kształtu i wielkości pod wpływem długości fotoperiodu. Ekspozycja *Betula pubescens* na działanie krótkiego fotoperiodu powoduje przejście rośliny w stan spoczynku zimowego bezwzględnie. Na tym etapie, w wyniku zamknięcia plazmodesm przez kalozę, nie obserwuje się jakiegokolwiek łączności



RYCINA 2. Układ pól symplastowych w merystemie apikalnym pędu roślin okrytozalążkowych (wg van der Schoot, Rinne [1999], zmienione)

symplastowej między komórkami merystemu apikalnego, zanikają więc pola symplastowe [56, 57].

Natomiast w wyniku działania długiego fotoperiodu, następuje indukcja do kwitnienia i przejście merystemu ze stanu wegetatywnego w generatywny. W tym okresie merystem apikalny jest izolowany symplastowo od pasm floemowych [21, 22]. Łączność symplastowa z floemem zostanie przywrócona dopiero w merystemie kwiatowym w momencie, kiedy pojawią się dojrzałe owoce [21]. Wydaje się, że odizolowanie symplastowe merystemu apikalnego pędu od pasm floemowych podczas indukcji do kwitnienia, czyli zmniejszenie stopnia komunikacji międzykomórkowej merystemu z pozostałymi częściami rośliny jest korzystne. Chroni ono merystem przed wpływem czynników, które mogłyby zaburzyć szereg procesów zachodzących w tym czasie [75]. U *Sinapis alba* w pierwszym oraz drugim dniu działania długiego fotoperiodu zmienia się organizacja i geometria merystemu. Centralne pole symplastowe, obserwowane z góry na powierzchni merystemu, zmienia wówczas swój kształt z trójkątnego na kolisty oraz rozrasta się trzykrotnie w porównaniu ze strefą peryferyczną [48]. W tym czasie następuje także dwu-, a nawet czterokrotny wzrost częstości występowania plazmodesm w warstwach L_1 , L_2 i L_3 oraz pomiędzy nimi zarówno w strefie centralnej, jak i w peryferycznej merystemu. Sytuacja ta nie trwa zbyt długo, ponieważ już w trzecim dniu działania długiego fotoperiodu, kiedy wzrasta częstość podziałów mitotycznych oraz zwiększa się objętość i wielkość komórek merystemu, nowo powstałe plazmodesmy zanikają [49]. Natomiast w merystemie apikalnym u *Iris*, w momencie przekształcenia merystemu wegetatywnego w generatywny następuje redukcja częstości występowania plazmodesm w obrębie warstwy L_2 oraz między warstwą L_2 i otaczającymi ją komórkami warstwy L_1 i korpusu. W tym przypadku nie mamy do czynienia z izolacją symplastową warstwy L_2 , jednakże następuje istotne zmniejszenie stopnia jej łączności symplastowej.

Należy przy tym zaznaczyć, że w tym samym czasie częstość występowania plazmodesm w warstwie L_1 i korpusie nie uległa zmianie [3].

W okresie indukcji do kwitnienia zmienia się geometria merystemu apikalnego pędu. Zachodzą także zmiany w systemie komunikacji symplastowej dzięki tworzeniu nowych plazmodesm i likwidacji już istniejących. I chociaż u *Sinapis alba* [49] dochodzi do zwiększenia, a u *Iris* [3] do zmniejszenia stopnia łączności symplastowej, zjawiska te świadczą o tym, jak dużą rolę w procesach rozwojowych pełnią plazmodesmy.

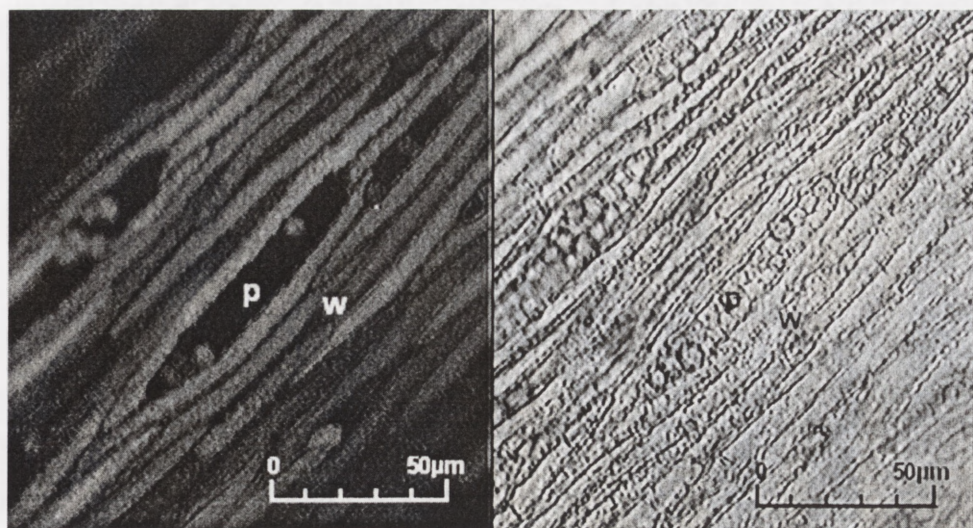
1.2.3. Izolacja symplastowa w kambium i łyku wtórnym

Kambium jest merystemem niejednorodnym (w jego skład wchodzi komórki wrzecionowate i promieniowe), którego aktywność zmienia się w ciągu roku [18, 27]. Analiza rozprzestrzeniania się jednego z symplastowych barwników fluorescencyjnych – fluoresceiny wykazała, że w kambium aktywnym u *Ulmus minor* i *Acer pseudo-platanus* komórki promieniowe są izolowane symplastowo od otaczających je komórek wrzecionowatych (ryc. 3). Natomiast w kambium spoczynkowym izolacja zanika, a między komórkami inicjalnymi wrzecionowatymi i promieniowymi zachowana jest łączność symplastowa [42].

Obecność izolacji symplastowej komórek inicjalnych w kambium aktywnym można wyjaśnić tym, że komórki te pełnią inne funkcje. W wyniku aktywności podziałowej komórek wrzecionowatych tworzony jest osiowy układ ksylemu i floemu, natomiast w wyniku podziałów komórek promieniowych powstaje układ poprzeczny. Stąd, podobnie jak w merystemie apikalnym pędu, w którym komórki z poszczególnych pól symplastowych pełnią odrębne funkcje [67], izolacja symplastowa w kambium aktywnym umożliwia dwóm rodzajom komórek inicjalnych funkcjonować niezależnie.

Van Bel i in. [65] przypuszczają, że zmiany stanów konformacyjnych plazmodesm wymagają nakładów energii. Najwięcej energii potrzebne jest do utrzymania stanu zamkniętego, stan otwarty plazmodesm wymaga znacznie mniejszych nakładów [65]. W związku z tym, jeśli w kambium spoczynkowym podziały komórkowe nie zachodzą, izolacja symplastowa komórek inicjalnych promieniowych od wrzecionowatych nie jest potrzebna. A skoro stan otwarty plazmodesm jest korzystniejszy pod względem energetycznym niż stan zamknięty, plazmodesmy w kambium spoczynkowym są otwarte, a między komórkami inicjalnymi utrzymywana jest łączność symplastowa.

Zjawisko izolacji symplastowej obecne jest także między komórkami floemu wtórnego. Promienie łykowe, które tworzą układ poprzeczny, są izolowane symplastowo od otaczających je komórek miększu osiowego i elementów przewodzących układu podłużnego. Izolacja symplastowa obecna jest w łyku zarówno zimowym, jak i wiosennym; nie mamy więc do czynienia, tak jak w kambium, ze zmianami sezonowymi [42]. Prawdopodobnie, w związku z tym, że łyko wtórne jest tkanką w pełni zróżnicowaną, która powstaje w wyniku podziałów peryklinalnych kambium [27] oraz ze względu na to, że w kambium aktywnym występuje izolacja symplastowa komórek promieniowych tworzących układ poprzeczny łyka i drewna wtórnego, obecność izolacji symplastowej promieni w łyku wtórnym jest ich własnością nadaną podczas procesu różnicowania.



RYCINA 3. Izolacja symplastowa komórek wrzęcionowatych od komórek promieniowych w kambium aktywnym u *Acer pseudoplatanus*; przekrój podłużny styczny; w – komórka wrzęcionowata, p – komórka promieniowa. Przedstawiono dwie mikrofotografie: pierwsza (po lewej stronie) wykonana w świetle niebieskim obrazuje rozprzestrzenianie się roztworu fluoresceiny (jasny kolor) między komórkami, druga mikrofotografia (po prawej) wykonana w świetle białym (zdjęcie wykonała K. Sokołowska)

1.3. Podsumowanie

Zjawiskiem regulacji łączności symplastowej, obecnością domen i pól symplastowych w organizmach roślinnych naukowcy zajmują się od ponad dwudziestu lat. Na początku jedynie obserwowano regiony izolowane symplastowo oraz wyznaczano wartości SEL w badanych obiektach. Z biegiem czasu coraz ciekawsze stawało się nie samo zagadnienie regulacji transportu symplastowego i obecności izolacji symplastowej, ale także moment ich pojawienia się w czasie rozwoju organizmu oraz pod wpływem czynników środowiskowych, mechanizm powstawania i rozszerzania granic pola czy domeny symplastowej, a przede wszystkim ich znaczenie w procesach wzrostu i różnicowania roślin, na które wskazują przytoczone w artykule przykłady.

LITERATURA

- [1] AAZIZ R, DINANT S, EPEL BL. Plasmodesmata and plant cytoskeleton. *Trends Plant Science* 2001; 6: 326–330.
- [2] ANISIMOV AV, EGOROV AG. Plazmadesmata as a modulator of osmotic water fluxes in plants. *Russian J Plant Physiol* 2002; 49: 677–684.
- [3] BERGMANS ACJ, DE BOER AD, DERKSEN JWM, VAN DER SCHOOT C. The symplasmic coupling of L_2 -cells diminishes in early floral development of *Iris*. *Planta* 1997; 203: 245–252.
- [4] BLACKMAN LM, HARPER JD, OVERALL RL. Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *Eur J Cell Biol* 1999; 78: 255–261.
- [5] CANTRILL LC, OVERALL RL, GOODWIN PB. Changes in symplastic permeability during adventitious shoot regeneration in tobacco thin cell layers. *Planta* 2001; 214: 206–214.

- [6] COMPLAINVILLE A, BROCARD L, ROBERTS I, DAX E, SEVER N, SAUER N, KONDOROSI A, WOLF S, OPARKA K, CRESPI M. Nodule initiation involves the creation of a new symplasmic field in specific root cells of *Medicago* species. *Plant Cell* 2003; **15**: 2778–2791.
- [7] CRAWFORD KM, ZAMBRYSKI PC. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1802–1812.
- [8] DERRICK PM, BAKER H, OPARKA KJ. Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to-cell spread of tobacco rattle virus from individually inoculated cells. *Plant Cell* 1992; **4**: 1405–1412.
- [9] DING B, HAUDENSHIELD JS, HULL RJ, WOLF S, BEACHY RN, LUCAS WJ. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 1992; **4**: 915–928.
- [10] DING B, ITAYA A, QI Y. Symplasmic proteins and RNA traffic: regulatory points and regulatory factors. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 596–602.
- [11] DUCKETT CM, OPARKA KJ, PRIOR DAM, DOLAN L, ROBERTS K. Dye-coupling in root epidermis of *Arabidopsis thaliana* is progressively reduced during development. *Development* 1994; **120**: 3247–3255.
- [12] EHLERS K, BINDING H, KOLLMANN R. The formation of symplasmic domains by plugging of plasmodesmata: a general event in plant morphogenesis? *Protoplasma* 1999; **209**: 181–192.
- [13] EHLERS K, KOLLMANN R. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin and functioning. *Protoplasma* 2001; **216**: 1–30.
- [14] EHLERS K, KOLLMANN R. Synchronization of mitotic activity in protoplast-derived *Solanum nigrum* L. microcalluses is correlated with plasmodesmal connectivity. *Planta* 2000; **210**: 269–278.
- [15] ERWEE MG, GOODWIN PB, VAN BEL A. Cell-cell communication in the leaves of *Commelina cyanea* and other plants. *Plant Cell Environ* 1985; **8**: 173–178.
- [16] ERWEE MG, GOODWIN PB. Characterization of the *Egeria densa* Planch. leaf symplast: inhibition of the intercellular movement of fluorescent probes by group II ions. *Planta* 1983; **158**: 320–328.
- [17] ERWEE MG, GOODWIN PB. Symplast domains in extrastellar tissues of *Egeria densa* Planch. *Planta* 1985; **163**: 9–19.
- [18] ESAU K. Anatomia roślin. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1973: 183–198.
- [19] FISHER DB, CASH-CLARK CE. Sieve tube unloading and post-phloem transport of fluorescent tracers and proteins injected into sieve tubes via severed aphid stylets. *Plant Physiol* 2000; **123**: 125–137.
- [20] FLETCHER JC, MEYEROWITZ EM. Cell signaling within the shoot meristem. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 23–30.
- [21] GISEL A, BARELLA S, HEMPEL FD, ZAMBRYSKI PC. Temporal and spatial regulation of symplastic trafficking during development in *Arabidopsis thaliana* apices. *Development* 1999; **126**: 1879–1889.
- [22] GISEL A, HEMPEL FD, BARELL S, ZAMBRYSKI P. Leaf-to-apex movement of symplastic tracer is restricted coincident with flowering in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 1713–1717.
- [23] GOODWIN PB. Molecular size limit for movement in the symplast of the *Elaeagnus* leaf. *Planta* 1983; **157**: 124–130.
- [24] HAN Y-Z, HUANG B-Q, ZEE S-Y, YUAN M. Symplastic communication between the central cell and the egg apparatus cells in the embryo sac of *Torenia fournieri* Lind. before and during fertilization. *Planta* 2000; **211**: 158–162.
- [25] HAYWOOD V, KRAGLER F, LUCAS WJ. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* 2002: S303–S325.
- [26] HEINLEIN M. Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 543–552.
- [27] HEJNOWICZ Z. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Organy wegetatywne. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002: 761–800.
- [28] HUKIN D, DOERING-SAAD C, THOMAS CR, PRITCHARD J. Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. *Planta* 2002; **215**: 1047–1056.
- [29] IMLAU A, TRUERNIT E, SAUER N. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 1999; **11**: 309–322.
- [30] ITAYA A, MA F, QI Y, MATSUDA Y, ZHU Y, LIANG G, DING B. Plasmodesmata-mediated selective protein traffic between “symplasmically isolated” cells probed by a viral movement protein. *Plant Cell* 2002; **14**: 2071–2083.
- [31] KIM I, HEMPEL FD, SHA K, PFLUGER J, ZAMBRYSKI PC. Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 2002; **129**: 1261–1272.
- [32] KIM M, CANIO W, KESSLER S, SINHA N. Developmental changes due to long distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 2001; **293**: 287–289.

- [33] KOLL S, BÜTTNER C. Cell-to-cell movement of plant viruses through plasmodesmata: a review. *Acta Phytopath Pflanz* 2000; **33**: 99–110.
- [34] KRAGLER F, LUCAS WJ, MONZER J. Plasmodesmata: Dynamics, Domains and Patterning. *Ann Bot* 1997; **81**: 1–10.
- [35] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Changes in the occurrence and ultrastructure of plasmodesmata in antheridia of *Chara vulgaris* L. during different stages of spermatogenesis. *Protoplasma* 1986; **132**: 179–188.
- [36] KWIATKOWSKA M. Plasmodesmal changes are related to different developmental stages of antheridia of *Chara* species. *Protoplasma* 2003; **222**: 1–11.
- [37] LINDSEY K, CASSON S, CHILLEY P. Peptides: new signaling molecules in plants. *Trends Plant Science* 2002; **7**: 78–83.
- [38] LUCAS JW, LEE J-Y. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature* 2004; **5**: 712–726.
- [39] LUCAS WJ, DING B, van der SCHOOT C. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol* 1993; **125**: 435–476.
- [40] LUCAS WJ. Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J Exp Bot* 1999; **50**: 979–987.
- [41] MARTENS HJ, HANSEN M, SCHULZ A. Caged probes: a novel tool in studying symplasmic transport in plant tissues. *Protoplasma* 2004; **223**: 63–66.
- [42] MASZTALERZ K. Symplasmic isolation in cambium and phloem cells and its seasonal variation. I Konferencja PTBER, Olsztyn 2003.
- [43] McLEAN BG, HEMPEL FD, ZAMBRYSKI PC. Plant intercellular communication via plasmodesmata. *Plant Cell* 1997; **9**: 1043–1054.
- [44] NAKAJIMA K, SENA G, NAWY T, BENFEY PN. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 2001; **413**: 307–311.
- [45] OPARKA KJ, ROBERTS AG, BOEVINK P, CRUZ SS, ROBERTS I, PRADEL KS, IMLAU A, KOTLIZKY G, SAUER N, EPEL B. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 1999; **97**: 743–754.
- [46] OPARKA KJ, ROBERTS AG. Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiol* 2001; **125**: 123–126.
- [47] OPARKA KJ. Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant cells. *J Exp Bot* 1991; **42**: 565–579.
- [48] ORMENESE S, HAVELANGE A, BERNIER G, VAN DER SCHOOT C. The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta* 2002; **215**: 67–78.
- [49] ORMENESE S, HAVELANGE A, DELTOUR R, BERNIER G. The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* 2000; **211**: 370–373.
- [50] OVERALL RL, BLACKMAN LM. A model of macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends Plant Science* 1996; **1**: 307–311.
- [51] OVERALL RL. Substructure of plasmodesmata. W: van Bel AJE, van Kesteren WJP [red.] Plasmodesmata. Structure, function, role in cell communication. Springer Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokyo 1999: 130–145.
- [52] PALEVITZ BA, HEPLER PK. Changes in dye coupling of stomatal cells of *Allium* and *Commelina* demonstrated by microinjection of Lucifer Yellow. *Planta* 1985; **164**: 473–479.
- [53] PFLUGER J, ZAMBRYSKI PC. The power of symplastic isolation. *Curr Biol* 2001; **11**: R436–R439.
- [54] PRADEL KS, ULLRICH CI, SANTA CRUZ S, OPARKA KJ. Symplastic continuity in *Agrobacterium tumefaciens*-induced tumours. *J Exp Bot* 1999; **50**: 183–192.
- [55] RADFORD JE, WHITE RG. Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J* 1998; **14**: 743–750.
- [56] RINNE PLH, KAIKURANTA PM, VAN DER SCHOOT C. The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J* 2001; **26**: 249–264.
- [57] RINNE PLH, VAN DER SCHOOT C. Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 1998; **125**: 1477–1485.
- [58] ROBERTS AG, OPARKA KJ. Plasmodesmata and control of symplastic transport. *Plant Cell Environ* 2003; **26**: 103–124.
- [59] ROBERTS IM, BOEVINK P, ROBERTS AG, SAUER N, REICHEL C, OPARKA KJ. Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* 2001; **218**: 31–44.
- [60] RUAN Y-L, LLEWELLYN DJ, FURBANK RT. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* 2001; **13**: 47–60.

- [61] RUAN Y-L, XU S-M, WHITE R, FURBANK RT. Genotypic and developmental evidence for the role of plasmodesmatal regulation in cotton fiber elongation mediated by callose turnover. *Plant Physiol* 2004; **136**: 4104–4113.
- [62] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-C?ZARES B, LUCAS WJ. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 1999; **126**: 4405–4409.
- [63] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-C?ZARES B, LUCAS WJ. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 202–209.
- [64] SOWIŃSKI P. Plazmodesmy jako element systemu komunikacji w roślinach. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 627–635.
- [65] VAN BEL AJE, GÜNTER S, VAN KESTEREN WJP. Plasmodesmata, a maze of questions. W: van Bel AJE, van Kesteren WJP [red.]. Plasmodesmata. Structure, function, role in cell communication. Springer Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokyo 1999: 18.
- [66] VAN BEL AJE, VAN RIJEN HVM. Microelectrode-recorded development of the symplasmic autonomy of the sieve element/companion cell complex in the stem phloem of *Lupinus luteus* L. *Planta* 1994; **192**: 165–175.
- [67] VAN DER SCHOOT C, RINNE P. Networks for shoot design. *Nature* 1999; **4**: 31–37.
- [68] WADA T, KURATA T, TOMINAGA R, KOSHINO-KIMURA Y, TACHIBANA T, GOTO K, MARKS D, SHIMURA Y, OKADA K. Role of positive regulator of root hair development *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 2002; **129**: 5409–5419.
- [69] WAIGMANN E, LUCAS WJ, CITOVSKY V, ZAMBRYSKI P. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1433–1437.
- [70] WAIGMANN E, ZAMBRYSKI P. Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* 1995; **7**: 2069–2079.
- [71] WHITE RG, BADELTK, OVERALL RL, Vesk. Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma* 1994; **180**: 169–184.
- [72] WRIGHT KM, OPARKA KJ. The fluorescent probe HPTS as a phloem-mobile symplastic tracer: an evaluation using confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot* 1996; **47**: 439–445.
- [73] WYMER CL, FERNÁNDEZ-ÁBALOS JM, DOONAN JH. Microinjection reveals cell-to-cell movement of green fluorescent protein in cells of maize coleoptiles. *Planta* 2001; **212**: 692–695.
- [74] ZAMBRYSKI P, CRAWFORD K. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2000; **16**: 393–421.
- [75] ZAMBRYSKI P. Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during development. *J Cell Biol* 2004; **162**: 165–168.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 04.04.2005 r.

Przyjęto: 11.07.2005 r.

ul. Kanonia 6/8, 50-137 Wrocław

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

SKŁADANIE RNA – FORMY ALTERNATYWNE, REGULACJA I FUNKCJE

ALTERNATIVE SPLICING – mRNA VARIANTS, REGULATION
AND FUNCTION

Monika Sylwia JĘDRZEJCZAK, Marek Leszek KOWALSKI

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie: Alternatywne składanie RNA jest procesem zwiększającym różnorodność powstających transkryptów RNA i w konsekwencji również białek. Szacuje się, że zjawisko to występuje w około 5–30% ludzkich genów. Jest to bardzo złożony proces regulowany przez liczne czynniki wzmacniające lub wyciszające, różne w zależności od lokalizacji tkankowej, wpływające na ostateczny poziom alternatywnego transkryptu. Znane są liczne przykłady białek tworzonych na alternatywnych matrycach, np. enzymów 15-LOB i COX. Alternatywne warianty białek mogą spełniać odmienne funkcje jak w przypadku IL-4. Poznanie mechanizmów alternatywnego składania RNA i ich regulacji budzi nadzieje na wykorzystanie tego procesu do diagnostyki, detekcji predyspozycji genetycznych lub jako celu dla potencjalnej terapii.

Słowa kluczowe: alternatywne składanie RNA, gen, regulacja, funkcja.

Summary: Alternative splicing is defined as a process that increases the diversity of transcripts and protein variety. It is estimated that 5–30% of human genes express alternative variants. Alternative splicing is regulated by different, tissue-specific splicing enhancers and silencers. Numerous proteins are the products of this process, as for example 15-lipoxygenase-b and cyclooxygenase. Alternative variants of proteins may have different functions like for example IL-4. Understanding the mechanism of alternative splicing and its regulation will allow to use this process for diagnosis, genetic predisposition detection or as a target for therapy.

Key words: alternative splicing, gene regulation, protein isoforms.

WSTĘP

Genom człowieka zawiera kilkadziesiąt tysięcy genów, czyli jest ich tylko dwukrotnie więcej niż u robaków czy owadów [8]. Stosunkowo mała liczba genów w genomach *Eukariota* nasuwa pytanie, co stanowi źródło tak olbrzymiej ich różnorodności [14].

Do mechanizmów, które zwiększają liczbę powstających izoform białka należy między innymi alternatywne składanie genu [5]. Może ponadto dochodzić do pobudzenia nieaktywnych wcześniej miejsc początku transkrypcji, różnych promotorów dla tego samego RNA, pozostawienia pewnych intronów lub usunięcia bądź pozostawienia określonych eksonów. Poliadenylacja zachodząca w różnych miejscach oraz wcześniejsze zakończenie pre-mRNA także przyczyniają się do zwiększenia liczby izoform białka [8]. Źródłem zmienności w populacji są ponadto polimorfizmy w obrębie pojedynczego genu (ang. *Single Nuclear Polimorphism* – SNP), zwiększające również liczbę powstających form białka. Do tej pory zidentyfikowano ponad 1,4 miliona SNP i zestawiono w odpowiedniej bazie danych [14].

Zmiany zachodzące w pre-mRNA obejmują dojrzewanie końca 5', cięcie i poliadenylację końca 3', metylację oraz składanie RNA (*splicing*). Składanie RNA polega na wycinaniu z pierwotnego transkryptu prekursorowego mRNA sekwencji niekodujących (intronów) i łączeniu fragmentów kodujących – eksonów [53]. W wyniku alternatywnego składania z jednego genu może powstać jedna lub kilka różnych cząsteczek mRNA. Obecnie szacuje się, że 5 do 30%, a nawet 40% ludzkich genów ulega temu procesowi, którego regulacja zależy może od stadium rozwoju, stanu fizjologicznego tkanki lub toczącego się procesu patologicznego [6, 49].

Zjawisko alternatywnego składania RNA budzi szerokie zainteresowanie wśród badaczy. Według bazy Medline każdego dnia pojawiają się dwa nowe doniesienia na temat alternatywnego składania genów [6]. Wzrastająca ilość badań w obszarze tego zagadnienia świadczy o wielu wciąż niepoznanych mechanizmach ekspresji genów.

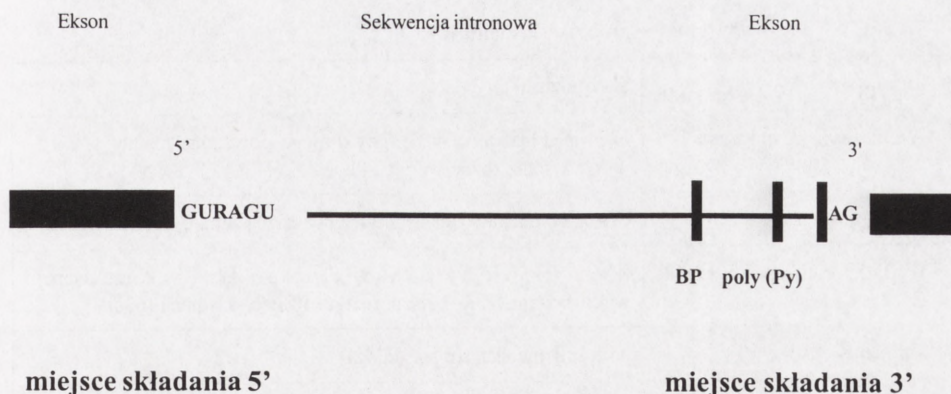
MECHANIZM SKŁADANIA RNA

Sekwencje kluczowe w procesie składania RNA

Składanie pierwotnego transkryptu odbywa się w jądrze komórkowym i poprzedza transport dojrzałego mRNA do cytoplazmy (ryc. 1). W obrębie pre-mRNA istnieją trzy sekwencje kluczowe dla procesu składania genu, warunkujące dokładność i efektywność procesu. Pierwszą z nich stanowią „miejsca splicingowe”, czyli miejsca, w których dochodzi do wycinania intronów. W górnej części intronu leży miejsce składania 5' zwane również miejscem donorowym, a dolną część ogranicza miejsce składania 3', czyli akceptor. Każdy intron rozpoczyna się sekwencją GURAGU (R jest puryną), a kończy dwoma nukleotydami – AG [8,14]. Drugą ważną sekwencją jest trakt polipirymidynowy, znajdujący się na końcu 3', kilkanaście zasad przed AG, będący sekwencją bogatą w cytydynę i urydynę, a ostatnią sekwencję stanowią miejsca rozgałęzienia [4].

Powstawanie spliceosomu

Proces składania genu przebiega w spliceosomie, będącym kompleksem pięciu snRNP (*small nuclear* – małych jądrowych RNP, powstałych przez połączenie snRNA ze specyficznymi białkami) i bardzo wielu innych białek pomocniczych (np. U2AF, pPTB, IBP) [18]. Małe jądrowe RNA (snRNA – U1, U2, U4, U5, U6) występują we



BP – sekwencja rozgałęziająca
poly (Py) – szlak polipirymidynowy

RYCINA 1. Kluczowe sekwencje składania RNA

wszystkich typach komórek, ale stanowią nie więcej niż 1% komórkowego RNA. Odgrywają ważną rolę w rozpoznawaniu intronów, określaniu miejsc składania i w katalitycznych reakcjach w obrębie spliceosomu.

Powstanie spliceosomu jest procesem o dużej dynamice, który ma na celu umieszczenie końców 5' i 3' intronu obok siebie. W momencie, gdy znajdują się one w centrum katalitycznym spliceosomu, dochodzi do wycięcia intronu i połączenia sąsiadujących ze sobą eksonów [8]. W pierwszym etapie U1-snRNA rozpoznaje komplementarną sekwencję końca 5' intronu [22]. W kolejnym etapie kompleks U4-U5-U6-snRNA wraz z białkami pomocniczymi przyłącza się do końca 3' miejsca składania. U5-snRNP lokuje się w miejscu U1-snRNP, a rozerwanie wiązań wodorowych między U4-snRNP i U6-snRNP wyzwala pełną aktywność katalityczną U6-snRNP. Sekwencja intronowa tworzy strukturę pętli powstałej z udziałem U2-, U5- i U6-snRNA. Do wycięcia intronu prowadzą dwie reakcje transestryfikacji. Po uwolnieniu intron ulega degradacji [10, 13].

Rola U5snRNP

Uważa się, że czynnik U5 snRNP odgrywa istotną rolę w modulowaniu i stabilizacji interakcji na poziomie RNA, gdyż jego nieobecność blokuje spliceosom, a w konsekwencji proces składania genu (tab. 1). Czynnik ten zapobiega ewentualnemu odłączeniu się eksonu 5' (powstającego po pierwszej transestryfikacji) od miejsca aktywnego spliceosomu, a następnie w drugim etapie katalitycznym bierze udział w łączeniu się końców eksonów 3' i 5' [22, 47, 48].

TABELA 1. Przykłady zmian w procesie składania RNA [24]

Zmiana	Skutki zmian
Alternatywne rozpoczęcie	N-koniec białka różni się, gdy do jego powstania zostały wykorzystane różne wersje eksonu 5' (18%)
Alternatywne zakończenie	C-koniec białka różni się z uwagi na różną ramkę odczytu (13%)
Wydłużenie eksonu (5' lub 3')	ekson może ulec wydłużeniu w kierunku 5' lub 3' w konsekwencji wykorzystania innych niż normalnie miejsc składania (6%)
Skrócenie eksonu	podobny mechanizm jw. (23%)
Ominięcie eksonu lub włączenie ukrytego	rozpoznanie nowych miejsc składania 5' lub 3' (40%)

REGULACJA PROCESU ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA GENU

Procesy fizjologiczne wymagają niezwykle precyzyjnych mechanizmów regulacji, różnych w zależności od np. lokalizacji tkankowej [24]. Istnieje duża grupa białek pełniących tę funkcję, których cechą charakterystyczną jest fakt posiadania dwóch domen – domeny łączącej się z RNA i łączącej się z białkami [7].

Eksonowe i intronowe elementy wzmacniające i hamujące składanie RNA

Alternatywne składanie RNA jest bardzo złożonym systemem z licznymi czynnikami wzmacniającymi lub wyciszającymi i w konsekwencji wpływającymi na ostateczny poziom alternatywnego transkryptu [10]. W zależności od lokalizacji i funkcji wyróżniamy: eksonowe elementy wzmacniające – ESEs (ang. *exonic splicing enhancers*), intronowe elementy wzmacniające – ISEs (ang. *intronic splicing enhancers*) oraz analogicznie elementy hamujące – ESSs (ang. *exonic splicing silencer*) i ISSs (ang. *intronic splicing silencer*) [8,17,22,26]. Pojedynczy element wzmacniający ESE przyczynia się do rozpoznania kilku miejsc składania podczas tego samego etapu tworzenia się spliceosomu. Wzmacniacze składania genu – ESE, znajdujące się na różnych eksonach, działają synergistycznie w procesie aktywacji miejsc składania [8, 17]. Jednocześnie liczne nieaktywne miejsca składania w intronach mogą być hamowane przez intronowe elementy hamujące proces składania genu – ISSs.

Rola białek z rodziny SR i ich antagoniści

Białka SR należą do rodziny wysoce konserwatywnych czynników regulujących proces składania genu [8,17,41]. Zbudowane są z domen RRM (ang. *RNA recognition element*) odpowiadających za specyficzne przyłączanie się do RNA i domeny SR

oddziałującej pomiędzy białkami [8,18,29]. Białka SR mogą przyłączać się do elementów wzmacniających w obrębie eksonów i poprzez bezpośrednią interakcję z U2AF i U1snRNP stymulować spliceosom do połączenia sąsiadujących ze sobą miejsc składania [10,18]. Biorą również udział w późniejszych etapach składania genu poprzez rekrutację kompleksu czynników: U4/U6,U5 [28, 29].

Istnieją rodziny białek działających antagonistycznie w stosunku do białek SR. Znane są białka hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) rozpoznające ESS i ISS, niezawierające domeny RS [18]. Znajdują się one w dużych ilościach w obrębie jądra komórkowego i w okolicy jąderkowych ziarnistości [8,30]. Istnieje też grupa białek podobnych do SR zwanych SRrps (*SR-related proteins*) mających domeny RRM.

Białka SR przyczyniają się do wyboru bliższego intronowi miejsca składania 5', jeżeli istnieje więcej niż jedno takie miejsce. Przeciwnie, nadmiar hnRNP A/B promuje wybór dystalnego miejsca składania 5'. Funkcjonalny antagonizm pomiędzy SF2/ASF – białkiem należącym do rodziny SR a hnRNP dotyczący miejsc składania jest oparty na kompetycyjnym łączeniu się tych białek z pre-mRNA [18, 30].

Białko U2AF a dwie klasy intronów

U2AF jest białkiem odgrywającym kluczową rolę w zainicjowaniu rozpoznania miejsca składania 3' oraz regionu rozgałęziającego [38]. Zbudowane jest ono z dwóch podjednostek – dużej U2AF65 i małej U2AF35. Podjednostka U2AF65 łączy się bezpośrednio z traktem polipirymidynowym i z sekwencją rozgałęziającą. U2AF35 ma natomiast zdolność rozpoznawania połączenia AG/G w miejscu składania 3' i ułatwia oddziaływanie U2snRNP z miejscem rozgałęzienia [13,39].

Rola U2AF jest nieco odmienna w zależności od klasy intronów biorących udział w składaniu genu. Pierwsza grupa intronów obejmuje tzw. AG-niezależne, które mają silny trakt polipirymidynowy. W ich przypadku pierwszy etap składania RNA zachodzi, nawet gdy jest mutacja w obrębie sekwencji AG. Czynniki U2AF łączy się z intronem efektywnie poprzez swoją większą podjednostkę i nie potrzebuje mniejszej podjednostki ani sekwencji AG. Konserwatywny dwunukleotyd AG potrzebny jest dopiero w drugim etapie procesu.

Sytuacja wygląda inaczej w przypadku tzw. intronów AG-zależnych, gdzie sekwencja AG odgrywa istotną rolę również w pierwszym etapie. Intryny zależne od AG mają krótszy, a tym samym słabszy szlak polipirymidynowy. Podjednostka większa U2AF65 przyłącza się do tych intronów ze znacznie mniejszą siłą i aby połączenie to było efektywne, potrzebuje dodatkowo połączenia pomiędzy AG a podjednostką mniejszą U2AF35. Gdy jest mutacja w obrębie AG, proces składania RNA nie zachodzi [9,40,50].

Czynnik hSlu7 a wybór dwunukleotydu AG

W sytuacji, gdy istnieje więcej niż jeden dinukleotyd AG, omijana jest para bliższa sekwencji rozgałęziającej i wybierana ta położona dalej od niej. Możliwość wymiennego wyboru AG dotyczy dwunukleotydów znajdujących się w odległości nie większej niż 30 nt od sekwencji rozgałęziającej. Duże zainteresowanie budzi czynnik hSlu7, pod nieobecność którego dochodzi do aktywacji alternatywnych par AG zamiast prawidłowych. Uważa się, że czynnik hSlu7 odpowiada za silne przyłączenie pierwszego

TABELA 2. Przykłady czynników regulacyjnych występujących w różnych tkankach [18, 30,49]

Białko	Charakterystyka
PTB <i>Polypirimidine tract binding protein</i>	łączy się z RNA, rozpoznaje szlak polipirymidynowy poprzedzający miejsce składania 3' i działa jako negatywny regulator w genie dla α -tropomiozyny lub α -aktyliny; przypuszcza się, że PTB i U2AF działają kompetycyjnie
CELF	należące do tej rodziny CELF3 i CELF5 znajdowano tylko w mózgu, ale CUG-BP, ETR-3 i CELF4 są rozpowszechnione znacznie szerzej; białka CELF przyłączają się do wzmacniaczy składania genu sercowej troponiny T (cTNT) i powodują włączenie eksonu 5
Sam68 (z rodziny STAR)	występuje w fibroblastach i limfocytach, gdzie łączy się z fosfolipazą C γ i kinazą fosfatydyloinozitolową p85 zaangażowanymi w transdukcję sygnału; oddziałuje z intronowym regulatorem RNA i białkiem FBP21 związanym ze spliceosomem; fosforylacja SAM68 zmienia jego zdolności łączenia się z innymi białkami
rSLM-2 (z rodziny STAR)	łączy się bezpośrednio z regionami RNA bogatymi w puryny i prawdopodobnie reguluje wybór miejsc składania; łączy się też z czynnikami regulacyjnymi SRp30c, ASF/SF2, htra2- β 1 i jednocześnie z końcem karboksylowym największej podjednostki polimerazy RNA II, przez co nasila proces składania genu; w białkach neurofilamentu powoduje włączenie eksonu 3, a w cząsteczkach CD44 eksonu 5

eksonu w obrębie spliceosomu [6,21]. Gdy nie ma czynnika hSlu7, ekson ten przyłączony jest luźno i w konsekwencji nie ma możliwości dotarcia do prawidłowego dwunukleotydu (AG), może jednak atakować pozostałe dwunukleotydy AG (tab. 2).

SKŁADANIE GENU A FAZY CYKLU KOMÓRKOWEGO

Uważa się, że białko SRp38 ma działanie hamujące proces składania genu. Białko to jest silnie aktywowane w wyniku defosforylacji, do której dochodzi podczas fazy M cyklu komórkowego. Aktywacja regulatorów mitozy przez ich defosforylację jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim, z reguły to fosforylacja prowadzi do aktywacji procesu [11,28,32].

TRANSKRYPCJA A SKŁADANIE GENU

Transkrypcja i dojrzewanie pre-mRNA nie są zjawiskami zupełnie od siebie niezależnymi. Istnieje silny związek czasowy i przestrzenny pomiędzy reakcjami tworzenia czapeczki, składania RNA a wydłużaniem RNA z udziałem polimerazy RNA II (pol II) [18,44,45]. Postuluje się istnienie wielkiej jednostki dla całego procesu powstawania RNA, tj. kompleksu, który może się przyłączać do chromatyny, złożonego z RNA polimerazy II i czynników transkrypcyjnych [30].

W procesie alternatywnego składania RNA ważna jest struktura promotora. W rzeczywistości większość genów ma tylko jeden promotor, więc kontrola odbywa się przez szereg regulujących czynników transkrypcyjnych, których różnorodność związana jest z lokalizacją tkankową. Białka te mogą też mieć różne funkcje w każdym z procesów [33, 27].

Biorąc pod uwagę zdolność stymulacji określonych etapów transkrypcji wyróżniono trzy klasy transkrypcyjnych domen aktywujących:

- 1) aktywatory klasy I stymulujące inicjację, np. Sp1, CTF/NF1,
- 2) aktywatory klasy II stymulujące wydłużanie, np. HIV-1, Tat,
- 3) aktywatory klasy III pobudzające oba etapy działania polimerazy II, np. VP16, p53, E2F1 [27].

TRANS-SPLICING

Proces składania RNA może przebiegać w dwóch formach przestrzennych. U większości znanych organizmów zachodzi w układzie cis, ale u niektórych, takich jak na przykład trypanosomy lub pewne gatunki nicieni, mamy do czynienia z układem trans [35,44,45,46].

W procesie składania RNA w układzie trans (analogicznie jak w układzie cis) w drodze etapowej transestryfikacji dochodzi do przyłączenia tzw. SL (*spliced leader sequence*) powstającej ze specyficznych dla procesu zachodzącego w układzie trans snRNP (SL RNP) i kofaktorów U2, U4 i U6 snRNP. U organizmów, u których składanie RNA zachodzi w układzie trans, obecny jest czynnik podobny do U5 snRNP, nazwany SLA2 RNA (związany z SL RNA) [22].

METODY ANALIZY ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA RNA

EST – alternatywne składanie RNA może być badane przez sekwencjonowanie fragmentów genomu, tworzenie baz EST (ang. *expressed sequence tag*) [2,3,12,15,25, 36,42,43,51,52]. W 1990 roku rozpoczęto w Stanach Zjednoczonych zgłoszony w 1985 roku projekt sekwencjonowania całego genomu ludzkiego – *Human Genome Project* (HGP) pod kierownictwem Narodowego Instytutu Zdrowia i Departamentu Energii Stanów Zjednoczonych, przewidujący skompletowanie całej sekwencji w ciągu 15 lat. Projekt ten ukończono w 2003 r. ogłaszając prawie całkowitą sekwencję genomu ludzkiego [1].

EST otrzymywane są przy wykorzystaniu metody PCR z różnych komórek i tkanek, z całkowicie przetworzonego mRNA, po zakończonym procesie składania, poliadenylacji i dojrzewania końca 5' [24]. W kolejnym etapie stworzono bazę EST pozwalającą na szybką identyfikację genów i tworzenie mapy genomu człowieka [1]. Korzystając z bazy zawierającej obecnie ponad 3,1 miliona sekwencji EST można również porównywać sekwencje wariantów mRNA ze znaną sekwencją genu. Na tej podstawie powstała nowa gałąź nauki – bioinformatyka [7].

ZNACZENIE ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA RNA

Uważa się, że 10–20 tys. ludzkich genów wykazuje alternatywne składanie RNA, z czego prawie 1000 skatalogowanych jest w bazie alternatywnie składanych wariantów występujących u ssaków AsMamDB (*Alternative Splicing Database of Mammals*) [15].

Badania na podstawie EST

Wykazano, iż prawie połowa ludzkich genów ma przynajmniej dwie formy utworzone poprzez alternatywne składanie. Przypuszcza się, że te dane liczbowe mogą być zaniżone z uwagi na zbyt jeszcze wąską bazę EST nieuwzględniającą rozmieszczenia poszczególnych izoform w różnych tkankach i w zależności od stadium rozwoju poszczególnych tkanek [6,7].

Szacuje się, że większość alternatywnych form składania RNA pojawia się w regionie 5' nieulegającym translacji (5'UTR). Około 70–88% modyfikacji prowadzi do zmiany struktury białka, z czego 19% wynika ze zmiany ramki odczytu i prowadzi do syntezy krótszego białka powstającego na matrycy utworzonej przez alternatywne składanie [7,14,15]. Modrek i wsp. zaobserwowali, że w 46% dochodzi do zmiany końca karboksylowego, 37% stanowią wewnętrzne delecje, insercje i substytucje, a w 17% zmiany są w N-końcu [15]. Badania na podstawie EST wykazały ponadto, że 25% genów ma odmienne alternatywne formy poliadenylacji [7,14].

Białka powstałe w wyniku alternatywnego składania RNA mają bardzo różną lokalizację w komórce. Największą pulę stanowią białka jądra (35%), następnie cytoplazmy (29%), macierzy zewnątrzkomórkowej (19%), błon (13%) i mitochondrium (4%). Niektóre białka mogą mieć więcej niż jedną lokalizację, a ponadto poszczególne izoformy mogą występować w różnych przedziałach komórkowych, np. β -receptor kwasu retinowego występuje w jądrze jako białka β -1 i β -2 oraz jako zlokalizowane w cytoplazmie białko β -3 [24].

Kolejnym zadaniem, jakie zostało postawione w czasie teoretycznych rozważań na podstawie EST, była próba oszacowania, jakich komórek i układów w szczególności dotyczy omawiane zjawisko. Wykazano, iż 29% genów, w których stwierdzono alternatywne składanie RNA, związanych jest z układem immunologicznym, a 12% dotyczy układu nerwowego. Uzasadnieniem takich wyników wydaje się fakt, że oba te systemy wymagają niezwykle precyzyjnej kontroli w zakresie różnicowania komórkowego i aktywacji. Pozwala to na przetworzenie olbrzymiej ilości informacji.

Proces alternatywnego składania RNA dotyczy głównie genów kodujących białka błon komórkowych (29%), 14% dotyczy białek sekrecyjnych, a 9% genów kodujących cząsteczki przekazujące sygnał. Kolejnymi dużymi grupami są czynniki regulujące transkrypcję (14%) i biorące udział w apoptozie (11%). Ogółem 75% alternatywnie powstających transkryptów odpowiada za funkcje związane z transdukcją sygnału w komórce [15].

Brett i wsp. [5] zbadali występowanie prawdopodobnych form alternatywnego składania RNA u siedmiu eukariotycznych organizmów poprzez porównanie ESTs z sekwencją ich mRNA wykorzystując do tego celu program BLAST. Oceniano ilość genów ulegających alternatywnemu składaniu i ilość transkryptów przypadających na jeden gen. U wszystkich badanych kręgowców i bezkręgowców wykazano podobną częstotliwość występowania

tego procesu. Alternatywne składanie RNA zwiększa możliwości kodowania genów, ale podobny jego poziom u różnych gatunków przeczy założeniu, iż proces ten stanowi istotne źródło złożoności genomu u wyższych organizmów [5].

Baza danych ISIS

Odmianą metodą posłużyli się Croft i wsp. [16] stwarzając własną bazę 170 000 sekwencji intronowych, spośród których szukali łączących się z nimi sekwencji EST. Połączenia z intronami znaleźli w 582 genach. Połączenia EST w obrębie sekwencji uznanych za intronowe wskazują na istnienie niewykrytych wcześniej, alternatywnie wycinanych eksonów. Na tej podstawie stworzono system do badania procesu ewolucji i funkcji intronów u eukariontów. Korzystając z bazy ISIS (ang. *Intron Sequence Information System*) można zapoznać się ze strukturą genów, gdyż przedstawiono w niej graficznie alternatywne regiony kodujące, miejsca połączeń z EST i sekwencje powtarzające się [16].

Baza danych ASAP

Informacje zgromadzone w bazie danych ASAP (ang. *Alternative Splicing Annotation Project*) obejmują dokładną strukturę połączeń ekson – intron, specyficzną lokalizację tkankową oraz izoformy białek powstających w wyniku alternatywnych form składania jednego RNA. Obecnie w bazie tej znajdują się informacje dotyczące 18 173 genów, zawierających więcej niż jeden ekson, z czego alternatywny proces składania RNA wykryto w 7991 spośród nich i opisano 30 793 zależności o podobnym charakterze. Opisano 667 alternatywnie powstających form związanych z określoną dystrybucją w tkankach. Najbardziej specyficznymi lokalizacjami wydają się być mózg, jądra, skóra i węzły chłonne. Formy wykazujące silną specyficzność tkankową nazwano większymi, a te, które nie wykazują takiej specyficzności, mniejszymi [23]. Skutki alternatywnego składania RNA przekładają się oczywiście na zmiany w drugo- i trzeciorzędowej strukturze białka [24].

Znaczenie mutacji dla procesu alternatywnego składania RNA

Mutacje w obrębie regionów niekodujących, takich jak miejsca składania 3' lub 5', w obrębie sekwencji rozgałęziającej oraz mutacje wpływające na poliadenylację często powodują wrodzone zaburzenia [18]. U ludzi około 15% chorób o podłożu genetycznym powstałych w wyniku mutacji punktowych związanych jest z zaburzeniami w procesie składania RNA [8]. Mogą one obejmować nieaktywne miejsca składania lub powodować powstawanie nowych, mogą prowadzić do zmiany przyłączania się białek SR i w konsekwencji do wycięcia jakiegoś eksonu w dojrzałym RNA (50% zbadanych mutacji dotyczyło białek SR, takich jak: SF2/ASF, SRp40, SRp55, SC35) [8,18]. Wydaje się, że główną przyczyną omijania eksonów są pojedyncze zmiany nukleotydów w eksonowych sekwencjach wzmacniających.

Zmiana drugorzędowej struktury pre-mRNA może wpływać na wybór miejsc składania, a tym samym na prawidłowe łączenie eksonów. Podobne skutki mają mutacje

nonsensowne oraz delecje i insercje w obrębie eksonów [31,34]. Mogą one powodować przedwczesne pojawienie się kodonów terminujących i prowadzić do syntezy krótszych, niefunkcjonalnych białek [18]. Mutacje w sekwencjach eksonowych niszczą z reguły motywy ESE i ESS. Mogą powodować usunięcie jednego lub kilku eksonów, ale nieraz eliminowana jest jednocześnie nonsensowna mutacja i zachowana zostaje translacyjna ramka odczytu [19]. Istnieją też tak zwane ciche mutacje, niezmieniające sekwencji aminokwasów, które również mogą wpływać na ESE i ESS i powodować zmiany w procesie składania RNA.

Mutacje dotyczące składania RNA można podzielić na podklasy. Podklasa I stanowi około 60% i dotyczy mutacji w niezmiennych sekwencjach miejsc składania, w wyniku czego eksony przestają być rozpoznawane. Mutacje I podklasy powodują ciężkie choroby, gdyż w ich wyniku nie dochodzi do powstawania prawidłowego transkrypty [19].

Podklasa II to mutacje w obrębie motywów zmiennych, prowadzące do powstawania jednocześnie transkryptów prawidłowego i alternatywnego poprzez wzmacnianie lub osłabianie motywów rozpoznających ekson. W tej podklasie znajdują się mutacje w intronach, które to generują ukryte miejsca donorowe lub akceptorowe i mogą prowadzić do częściowego włączenia sekwencji intronowych. Skutki mutacji podklasy II są łagodniejsze, ponieważ powstaje transkrypt prawidłowy [19].

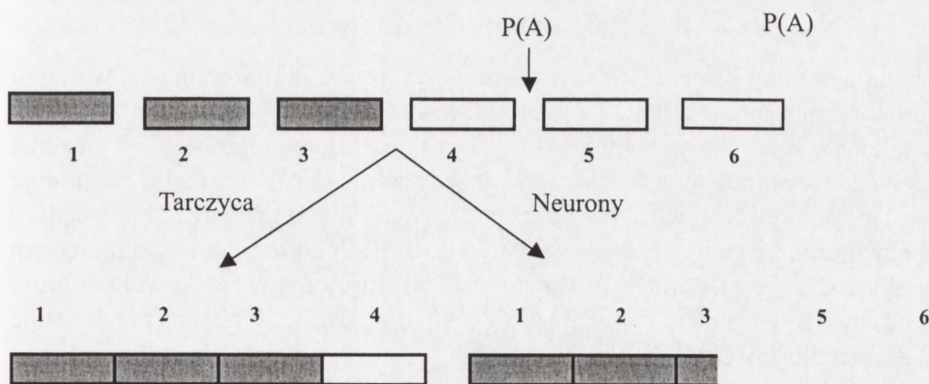
W niektórych przypadkach mutacja może mieć wpływ pozytywny. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest ciężką, postępującą chorobą degeneracyjną mięśni spowodowaną mutacją w genie dystrofiny. Nonsensowne mutacje w tym genie prowadzą z reguły do wcześniejszego zakończenia syntezy i powstania w wyniku tego krótszego białka. Jednakże mutacja E1211X w sekwencji ESE prowadzi do ominięcia eksonu 27 i tylko częściowej zmiany ramki odczytu, a w konsekwencji do znacznie łagodniejszej formy klinicznej choroby nazwanej Dystrofią mięśniową Beckera [20].

ZNACZENIE ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA RNA W PATOLOGII CHORÓB

Kalcytonina/CGRP

Klasyczny przykład alternatywnego składania RNA stanowi gen dla kalcytoniny (ryc. 2), na którego matrycy powstają dwa różne białka o odmiennej lokalizacji tkankowej. W tarczycy dochodzi do ekspresji kalcytoniny, powstałej w wyniku połączenia czterech pierwszych eksonów. W neuronach powstaje natomiast CGRP – białko będące produktem genu dla kalcytoniny po złożeniu eksonów 1, 2, 3, 5 i 6.

Regulacja tego procesu wydaje się być zależna od istniejącego w eksonie 4-eksonowego elementu wzmacniającego, do którego przyłącza się SRp55. Różna ilość białka SRp55 w różnych tkankach może odpowiadać za regulację alternatywnego składania genu. Istotny jest także udział hormonów. W badaniu obejmującym pacjentów poddanych leczeniu deksametazonem z powodu nowotworu wywodzącego się z komórek rdzenia tarczycy stwierdzono wzrost mRNA dla kalcytoniny i jednoczesny spadek mRNA dla CGRP [37].



RYCINA 2. Alternatywne składanie genu CGRP

IL-4 i jej forma alternatywna IL-4 δ 2

IL-4 jest kluczową cytokiną biorącą udział w powstawaniu odpowiedzi IgE-zależnej i w rozwoju zapalenia alergicznego. Różnicuje ona dojrzewające limfocyty T w kierunku Th2 i prowadzi do uwalniania przez nie odpowiednich cytokin (IL-4,5,9,13), indukuje przełączenie immunoglobulin w kierunku izotypu IgE oraz nasila IgE-zależną aktywację komórek tucznych. Wpływa ponadto na ekspresję cząsteczki adhezyjnej VCAM-1, zwiększa liczbę receptorów obecnych na powierzchni komórki i nasila sekrecję śluzu.

Gen dla interleukiny 4 znajduje się na chromosomie 5 w obszarze q23-31 i składa się z czterech eksonów. W wyniku jego ekspresji powstają dwa produkty: prawidłowa IL-4 oraz IL-4 δ 2 (alternatywna forma składania RNA z wycięciem eksonu 2), będąca swoistym inhibitorem dla receptora IL-4. IL-4 δ 2 hamuje stymulację limfocytów T, sekrecję PGE₂ przez monocyty, syntezę IgE przez limfocyty B i ekspresję CD23.

W niestymulowanych komórkach krwi obwodowej stwierdzono większą ilość produktu prawidłowego w stosunku do alternatywnego u pacjentów z astmą atopową w porównaniu z osobami chorymi na gruźlicę i grupą kontrolną [55]. W komórkach pobranych podczas biopsji z drzewa oskrzelowego stwierdzono natomiast, że osoby z astmą mają wyższą ekspresję IL-4 δ 2 niż osoby zdrowe [54]. Sugeruje się, że równowaga pomiędzy IL-4 a IL-4 δ 2 może regulować przebieg procesu zapalnego w astmie. Nasze obserwacje obejmujące 18 pacjentów z astmą atopową i 14 osób zdrowych wykazały obecność produktu alternatywnego składania genu IL-4. U wszystkich badanych istnieje wyższa ekspresja formy prawidłowej genu dla IL-4 w stosunku do izoforny IL-4 δ 2. Nie stwierdziliśmy natomiast różnicy w nasileniu procesu alternatywnego składania RNA między osobami zdrowymi a chorymi z astmą atopową. Poziom ekspresji zarówno konstytutywnej, jak i alternatywnej formy składania genu dla IL-4 nie ulega zmianie w zależności od nasilenia procesu chorobowego w astmie [56].

IL-2 i jej izoformy alternatywne

Kolejną cytokiną, której izoformy są kompetycyjnymi inhibitorami dla wariantu prawidłowego, jest interleukina 2. Cytokina ta spełnia rozmaite funkcje, między innymi bierze udział w różnicowaniu limfocytów B i sekrecji immunoglobulin. Wzmacnia cytotoksyczność monocytów, nasila fagocytozę i proliferację makrofagów, stymuluje proliferację komórek NK i ich aktywność cytologiczną. Wykryto dwa produkty będące wynikiem alternatywnego składania RNA dla IL-2: IL-2 δ 2 powstającą z ominięciem eksonu 2 i IL-2 δ 3 bez eksonu 3. W przeciwieństwie do formy prawidłowej izoformy składania alternatywnego nie stymulują proliferacji limfocytów T i hamują przyłączenie rhIL-2 do receptorów dla IL-2 [62].

15-LOb i jej izoformy

15-lipoksygenaza (15-LO) należy do grupy enzymów katalizujących przekształcenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do lipoksyn. U ludzi opisano kilka jej rodzajów: 5-LO, 12-LO, 12R-LO, 15-LOa, 15-LOb. 15-LOb powoduje hydroksylację kwasu arachidonowego w pozycji 5 lub 15 w konfiguracji S. Prowadzi to do powstania pochodnej 15-HETE kwasu arachidonowego, a w konsekwencji również lipoksyn, substancji o potencjalnie modulującym wpływie na stany zapalne. Gen dla 15-LOb znajduje się na chromosomie 17 i zawiera 14 eksonów. W procesie składania RNA, na skutek usunięcia eksonu 9 powstaje izoforma 15-LOb2 (*15-LOXb sv-a*). Nowo powstały enzym wykazuje odmienną od swego prekursora aktywność katalityczną. Ulega on inaktywacji przez powstające produkty już po 1–2 minutach, a nie po 30 minutach jak w przypadku 15-LOb. Istnieją ponadto: *15-LOXb sv-b*, która powstaje w wyniku wycięcia eksonu 9. części eksonu 10. i całego eksonu 11., na skutek czego enzym staje się nieaktywny oraz *15-LOXb sv-c* będąca wynikiem pozostawienia intronu 12., co prowadzi do zmiany ramki odczytu i wcześniejszego wystąpienia kodonu stopu. Produkt powstający na tej matrycy jest nieaktywny, ponieważ w wyniku składania mRNA w końcu karboksylowym usunięta zostaje izoleucyna, potrzebna do regulacji katalitycznego żelaza [63].

COX-1 i jej izoformy

Cyklooksygenazy są grupą enzymów odgrywających istotną rolę w procesie zapalnym. Białka te katalizują transformację kwasu arachidonowego, będącego składnikiem błon lipidowych prowadząc do powstania prostaglandyn, tromboksanów i prostacyklin. Istnieją dwie izoformy enzymu COX-1 – występująca konstytutywnie i forma indukowana COX-2. Gen dla COX-1 znajduje się na chromosomie 9q32-33.3, a dla COX-2 na chromosomie 1q25.2-q25.3.

Znane są alternatywne warianty składania RNA dla COX-1. Istnieje forma transkryptu opisywana jako COX-3, gdy nie dochodzi do wycięcia intronu 1 oraz warianty składania genu prowadzące w konsekwencji do powstania białek krótszych. Są to PCOX-1a i PCOX-1b powstałe w wyniku usunięcia eksonów od 5 do 8, przy czym w przypadku PCOX-1 podobnie jak w COX-3 pozostaje intron 1. COX-3 ma aktywność enzymatyczną odmienną od COX-1, zależną od procesów glikozylacji. COX-

3 jest hamowana swoiście (w porównaniu z COX-1 i COX-2) przez niesteroidowe leki przeciwzapalne, takie jak acetaminofen, fenacetyna [59].

Prowadzone są również ciekawe badania dotyczące alternatywnej formy składowania, opisywanej jako COX-1SV, powstającej na matrycy RNA COX-1, ale krótszej o pierwsze 150 nt. Wiadomo, że prostaglandyny będące produktami metabolizmu cyklo-oksygenaz odgrywają istotną rolę w obronie śluzówki żołądka. Wykazano zmiany w ekspresji obu wariantów COX-1 w zależności od wieku pacjentów. U osób starszych dominowała izoforma COX-1SV, co może mieć istotny związek z malejącą z wiekiem protekcją śluzówki [60].

Stwierdzono także, że COX-1SV stanowi 2% ekspresji całkowitego mRNA białka COX-1 w komórkach raka jelita grubego. Poziom COX-1SV wzrastał w przypadku guzów jelita grubego i odbyticy, a następnie ulegał obniżeniu, po zastosowaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych, do wartości wykrywanych w śluzówce osób zdrowych [61].

Uważa się, że produkty transformacji kwasu arachidonowego powstające na szlaku cyklooksygenazowym są zaangażowane w patomechanizm astmy. Prowadząc badania nad ekspresją cyklooksygenaz stwierdziliśmy, że w ludzkich leukocytach obecny jest jeszcze jeden produkt alternatywnego składowania genu COX-1. Białko to powstaje na skutek delecji fragmentu mRNA o długości 111 nukleotydów, stanowiących ekson 9. Stwierdziliśmy, że u osób z astmą istnieje wyższa ekspresja formy prawidłowej w stosunku do izoformy alternatywnej w porównaniu z grupą kontrolną. Czynnościowe znaczenie tego zjawiska nie zostało jak dotąd poznane. Nie wykazaliśmy istotnych statystycznie różnic w ekspresji obu izoform białka COX-1 pomiędzy pacjentami z astmą oskrzelową tolerującymi aspirynę a osobami chorującymi na astmę z nadwrażliwością na aspirynę, u których zaburzenia syntezy PGE₂ uznane są za kluczowy element patomechanizmu nadwrażliwości [57,58].

PODSUMOWANIE

Alternatywne składowanie RNA odgrywa istotną rolę w tworzeniu zróżnicowanych sekwencyjnie matryc translacyjnych, powstających z tego samego genu, a w konsekwencji prowadzi do powstania olbrzymiej puli białek o różnorodnych funkcjach. Istnienie tego zjawiska może stanowić podłoże powstania pewnych chorób. Ważne jest dokładne poznanie mechanizmów regulacji ekspresji genów i syntezy białek oraz wzajemne relacje pomiędzy tymi procesami. Znaczenie alternatywnego składowania RNA i mechanizmów jego regulacji wydaje się niezwykle istotne, budzi nadzieje na możliwość wykorzystania w przyszłości w celu lepszego wykrywania chorób, wcześniejszej detekcji predyspozycji genetycznych do pojawienia się choroby lub jako celu dla potencjalnej terapii.

PIŚMIENNICTWO

- [1] VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW et al. The Human Genome. *Science* 2001; **291**: 1305–1351.
- [2] LIANG F, HOLT I, PERTEA G. Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nature Genetics* 2000; **25**: 239–240.

- [3] EWING B, GREEN P. Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nature Genetics* 2000; **25**: 232–234.
- [4] WEBSTER NJ, HUANG Z. Hormonal regulation of alternative splicing. *Front Horm Res* 1999; **25**: 1–17.
- [5] BRETT D, HEIKE P, VALCARCEL J. Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics* 2002; **30**: 29–30.
- [6] SOREK R, AMITAI M. Piecing together the significance of splicing. *Nature Biotechnology* 2001; **19**: 196.
- [7] MODREK B, LEE Ch. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* 2002; **30**: 13–19.
- [8] MANIATIS T, TASIC B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 2002; **418**: 236–243.
- [9] GRAVELEY BR. Sex, Agility, and the Regulation of Alternative Splicing. *Cell* 2002; **109**: 409–412.
- [10] BLACK DL. Protein Diversity from Alternative Splicing: A Challenge for Bioinformatics and Post-Genome Biology. *Cell* 2000; **103**: 367–370.
- [11] MATTER N, HERRLICH N, KONING H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 2002; **420**: 691–695.
- [12] SCHULER GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* 1997; **75**: 694–698.
- [13] STANLEY JP, GUTHRIE C. Mechanical Devices of the Spliceosome: Motors, Clocks, Springs, and Things. *Cell* 1998; **92**: 315–326.
- [14] INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**: 860–921.
- [15] MODREK B, RESCH A, GRASSO C, LEE Ch. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Research* 2001; **29**: 2850–2859.
- [16] CROFT L, SCHANDORFF S, CLARK F. ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. *Nature Genetics* 2000; **24**: 340–341.
- [17] LAM BJ, HERTEL KJ. A general role for splicing enhancers in exon definition. *RNA* 2002; **8**: 1233–1241.
- [18] CACERES JF, KORNBLIHTT AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics* 2002; **18**: 186–193.
- [19] NISSIM-RAFINIA M, KEREM B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends in Genetics* 2002; **18**: 123–127.
- [20] SHIGA N, TAKESHIMA Y, SAKAMOTO H, INOUE K, YOKOTA Y, YOKOYAMA M, MATSUO M. Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2204–2210.
- [21] CHUA K, REED R. The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. *Nature* 1999; **402**: 207–210.
- [22] NEWMAN AJ. The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing. *EMBO J* 1997; **16**: 5797–5800.
- [23] LEE Ch, ATANELOV L, MODREK B, XING Y. ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: 101–105.
- [24] BOUES, VINGRON M, KRIVENTSEVA E, KOCH I. Theoretical analysis of alternative splice forms using computational methods. *Bioinformatics* 2002; **18**: S65–S73.
- [25] CASTILLO-DAVIS CI, MEKHEDOV SL, HARTL D, KOONIK E, KONDRASHOV A. Selection for short introns in highly expressed genes. *Nature Genetics* 2002; **31**: 415–418.
- [26] COWARD E, HAAS S, VINGRON M. SpliceNest: visualizing gene structure and alternative splicing based on EST clusters. *Trends in Genetics* 2002; **18**: 53–54.
- [27] NOGUES G, KADENER S, CRAMER P, BENTLEY D. Transcriptional Activators Differ in Their Abilities to Control Alternative Splicing. *J Biol Chem* 2002; **277**: 43110–43114.
- [28] SHIN C, MANLEY JL. The SR Protein SRp38 Represses Splicing in M Phase Cells. *Cell* 2002; **111**: 407–417.
- [29] COWPER A, CACERES J, MAYEDA A, SCREATON G. Serine-Arginine (SR) Protein-like Factors That Antagonize Authentic SR Proteins and Regulate Alternative Splicing. *J Biol Chem* 2001; **276**: 48908–48914.
- [30] STOSS O, OLBRICH M, HARTMANN A, KONIG H. The STAR/GSG Family protein rSLM-2 Regulates the Selection of Alternative Splice Sites. *J Biol Chem* 2001; **276**: 8665–8673.
- [31] LIU H, CARTEGINI L, ZHANG M, KRAINER A. A mechanism for exon skipping caused by nonsens and missense mutation in BRCA1 and other genes. *Nature Genetics* 2001; **27**: 55–58.

- [32] CHO R, HUANG M, CAMPBELL M, DONG H. Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nature Genetics* 2001; **27**: 48–54.
- [33] PRUDOFOT N, FURGER A, DYE M. Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* 2002; **108**: 501–512.
- [34] PAGANI F, BURATTI E, STUANI C, BEBDIX R. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nature Genetics* 2002; **30**: 426–429.
- [35] ABELSON J, TROTTA Ch., LI H. tRNA Splicing. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12685–12688.
- [36] NEUBAUER G, KING A, RAPPILBER J, CALVIO C. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics* 1998; **20**: 46–50.
- [37] LOU H, GAGEL RF. Alternative RNA processing – its role in regulating expression calcitonin/calcitonin gene-related peptide. *J Endocrinol* 1998; **156**: 401–405.
- [38] WU S, ROMFO C, NILSEN T, GREEN M. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF. *Nature* 1999; **402**: 832–835.
- [39] ZORIO D, BLUMENTHAL T. Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1999; **402**: 835–838.
- [40] MERENDINO L, GUTH S, BILBAO D, MARTINEZ C. Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF and the 3' splice site AG. *Nature* 1999; **402**: 838–841.
- [41] DAM D, ZILCH Ch. Regulation of Alternative Splicing of CD45 by Antagonistic Effects of SR Protein Splicing Factors. *J Immunol* 2000; **164**: 5287–5299.
- [42] FRANTZ S, THIARA A, LODWICK D. Exon repetition in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5400–5405.
- [43] GUAHTHERET D, POIROT O, LOPEZ F. Alternate Polyadenylation in Human mRNAs: A Large-Scale Analysis by EST Clustering. *Genome Research* 1998; **8**: 524–528.
- [44] FINTA C, ZAPHIROPOULOS PG. Intergenic mRNA Molecules Resulting from trans-Splicing. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5882–5889.
- [45] DORN R, REUTER G, LOEWENDORF A. Transgene analysis proves mRNA trans-splicing at the complex mod(mdg4) locus in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9724–9729.
- [46] CAUDEVILLA C, SERRA D, MILIAR A. Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12185–12190.
- [47] REED R, HURT E. A conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing. *Cell* 2002; **108**: 523–531.
- [48] VILLA T, PLEISS JA, GUTHERIE C. Spliceosomal snRNAs: Mg²⁺ Dependent Chemistry at the Catalytic Core? *Cell* 2002; **109**: 149–152.
- [49] SCHMUCKER D, CLEMENS JC, SHU H, WORBY CA, XIAO J, MUDA M, DIXON JE, ZIPURSKY SL. *Drosophila* Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell* 2000; **101**: 671–684.
- [50] LALLENA MJ, CHALMERS KJ, LLAMAZARES S, LAMOND AI, VALCARCEL J. Splicing Regulation at the Second Catalytic Step by Sex-lethal Involves 3' Splice Site Recognition by SPF45. *Cell* 2002; **109**: 285–296.
- [51] XU Q, MODREK B, LEE C. Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Research* 2002; **30**: 3754–3766.
- [52] IRIZARRY K, KUSTANOVICH V. Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. *Nature Genetics* 2000; **26**: 233–236.
- [53] LAWRENCE J. Shared Strategies in Gene Organization among Prokaryotes and Eukaryotes. *Cell* 2002; **110**: 407–413.
- [54] GLARE E, DIVJAK M. Asthmatic airway biopsy specimens are more likely to express the IL-4 alternative splice variant IL-4δ2. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **104**: 978–982.
- [55] SEAH GT, GAO PS, HOPKIN JM. Interleukin-4 and Its Alternatively Spliced Variant (IL-4δ2) in Patients with Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**: 1016–1018.
- [56] JEDRZEJCZAK M, BOROWIEC M, PTASINSKA A, WYSOCZYNSKA K, BIENKIEWICZ B, WOSZCZEK G, KOWALSKI ML. Alternatywne transkrypty mRNA genu interleukiny 4 w leukocytach krwi obwodowej u chorych z astmą oskrzelową. *Alergia Astma Immunologia* 2003; **8**: 188–193.
- [57] BOROWIEC M. Rozprawa doktorska pt: „Identyfikacja oraz ocena częstości występowania polimorfizmów w sekwencjach genów dla cyklooksygenaz (COX-1, COX-2) u osób tolerujących i nadwrażliwych na aspirynę i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne” 2002.

- [58] WOSZCZEK G, KOWALSKI M.L, BOROWIEC M, CIESLAK M. Cyclooxygenase-1 alternatively spliced variant is overexpressed in peripheral blood leukocytes of asthmatic patients. *Eur Resp J* 2002 (abstract); **20**: 79–85.
- [59] CHANDDRASEKHARAN NM, DAI H, ROSS KL, EVANSON NK, TOMSIK J, ELTON TS, SIMMONS DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 13926–13931.
- [60] VOGIAGIS D, GLARE E, MISAJON A, BROWN W, O'BRIEN PE. Cyclooxygenase-1 and an alternatively spliced mRNA in the rat stomach: effects of aging and ulcers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **278**: G820–827.
- [61] VOGIAGIS D, BROWN W, GLARE E. Rat colorectal tumours treated with a range of non-steroidal anti-inflammatory drugs show altered cyclooxygenase-2 and cyclooxygenase-1 splice variant mRNA expression levels. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 869–874.
- [62] TSYTSIKOV V, YUROVSKY V, ATAMAS S. Identification and Characterization of Two Alternative Splice Variants of Human Interleukin-2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 23055–23060.
- [63] BHATIA B, MALDONADO CJ, TANG S, CHANDRA D, KLEIN RD, CHOPRA D, SHAPPELL SB, YANG P, NEWMAN RA, TANG DG. 2003. Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants. *J Biol Chem* **278**(27): 25091–25100.
- ..

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 07.09.2005 r.

Przyjęto: 15.09.2005 r.

ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

e-mail: mjedrzejczak@mediclub.pl

REGULATOROWA ROLA TLENKU AZOTU W APOPTOZIE*

NITRIC OXIDE AS A BIOREGULATOR OF APOPTOSIS

Małgorzata KRZYŻOWSKA

Pracownia Immunologii, Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii,
Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW

Streszczenie: Tlenek azotu (NO) syntetyzowany z L-argininy przez syntazy tlenku azotu jest silnie dyfundującym i reaktywnym związkiem odgrywającym dużą rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Jeden z tych procesów, apoptoza, odgrywa istotną rolę w przebiegu prawidłowego rozwoju embrionalnego oraz utrzymaniu homeostazy organizmów wielokomórkowych. W niektórych komórkach NO może sprzyjać indukcji apoptozy (efekt pro-apoptotyczny), zaś w innych może hamować apoptozę (efekt anti-apoptotyczny). Efekt końcowy NO zależy od stopnia produkcji związku oraz jego oddziaływania z innymi cząsteczkami, takimi jak: tiole, reaktywne formy tlenu i białka. Długotrwała produkcja NO działa jako czynnik indukujący apoptozę przez uwalnianie cytochromu c z mitochondriów i aktywacji kaspaz, wzrostu ekspresji białka p53, aktywacji kinaz aktywowanych stresem (JNK/SAPK) oraz spadku ekspresji anti-apoptotycznego białka bcl-2. W niskim bądź fizjologicznym stężeniu NO chroni przed apoptozą poprzez uruchomienie szlaków zależnych od cyklicznego guanozyno-5'-monofosforanu (cGMP), wiążących się z aktywacją m.in. kinazy białkowej G (PKG), wzrostem ekspresji anti-apoptotycznych białek bcl-2 i hsp 70 oraz poprzez bezpośrednią S-nitrozylację enzymów efektorowych apoptozy – kaspaz. W niniejszej pracy przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący roli antyapoptotycznego działania NO.

Słowa kluczowe: apoptoza, tlenek azotu (NO), anion nadazotynowy, cGMP, S-nitrozylacja, kaspazy, bcl-2.

Summary: Nitric oxide (NO), synthesized from L-arginine by NO synthases, is a small, diffusible, highly reactive molecule with dichotomous regulatory roles under physiological and pathological conditions. Apoptosis plays an important role in the development of the organism but also under various pathological conditions. NO can exert both pro- and anti-apoptotic effects, depending on the conditions and cell type. Long-lasting production of NO acts as a proapoptotic modulator by activating caspase family proteases through the release of mitochondrial cytochrome c into the cytosol, upregulation of p53 expression, activation of JNK/SAPK, and altering the expression of apoptosis-associated proteins including Bcl-2 family proteins. However, low or physiological concentrations of NO prevent cells from apoptosis via expression of protective genes such as heat shock proteins, Bcl-2 as well as direct inhibition of the apoptotic caspase family proteases by S-nitrosylation of the cysteine thiol. Our current

*Praca sfinansowana w ramach grantu KBN nr 3 P04A 022 25

understanding of the mechanisms by which NO influences both pro- and antiapoptotic actions is discussed in this review.

Key words: apoptosis, nitric oxide (NO), peroxynitrite, cGMP, S-nitrosylation, caspase, bcl-2 .

Wykaz zastosowanych skrótów: **AIF** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę, **Apaf-1** (*dATP/ATP-dependent apoptotic protease activating factor-1*) – zależny od dATP/ATP czynnik aktywujący proteazę, **A-SMase** (*acid sphingomyelinase*) – kwaśna sfingomyelinaza, **CARD** (*caspase recruiting domain*) – domena rekrutująca kaspazę, **CREB** (*cAMP response element binding protein*) – białko wiążące element odpowiedzi na cAMP, **cGMP** (*cyclic guanosine monophosphate*) – cykliczny guanozyno monofosforan, **eNOS** (*endothelial nitric oxide synthase*) – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu, **ERK** (*extracellular signal-related kinase*) – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym, **HSP** (*heat shock proteins*) – białka szoku cieplnego, **IFN** – interferon, **iNOS** (*inducible nitric oxide synthase*) – indukowalna syntaza tlenku azotu, **JNK** (*c-Jun N-terminal kinase*) – N-końcowa kinaza czynnika transkrypcyjnego c-Jun, **MAPK** (*mitogen-activated protein kinase kinases*) – kinazy kinaz kinaz białkowych aktywowanych mitogenem, **mtNOS** (*mitochondrial nitric oxide synthase*) – mitochondrialna syntaza tlenku azotu, **NADPH** – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, **nNOS** (*neuronal nitric oxide synthase*) – neuronalna syntaza tlenku azotu, **NF-κB** (*nuclear factor κB*) – czynnik transkrypcyjny κB, **NO** (*nitric oxide*) – tlenek azotu, **N-Smase** (*neutral sphingomyelinase*) – sfingomyelinaza obojętna, **ODQ** (*1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ono*) – 1-H-oksodiazolo-4,3-a] chinoksalino-1-on, **PARP** (*poli (ADP)ribose polymerase*) – polimeraza poli(ADP) rybozy, **PKC** (*protein kinase C*) – kinaza białkowa C, **PKG** (*protein kinase G*) – kinaza białkowa G, **RNOS** (*reactive nitric oxide species*) – reaktywne formy tlenku azotu, **ROS** (*reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu, **SAPK** (*stress-activated protein kinase*) – kinaza aktywowana stresem, **sGC** (*soluble guanyl cyclase*) – cytozolowa cyklaza guanylowa, **Smac/DIABLO** (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI*) – drugi czynnik mitochondrialny, **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu.

1. WSTĘP

Tlenek azotu (NO) jest lipofilowym i silnie dyfundującym związkami, którego działanie zależy zarówno od stężenia, jak i postaci występowania w komórce. Stanowi on rodnik uważany za pierwotnego mediatora uszkodzeń komórek oraz tkanek w stanach chorobowych. Najnowsze badania wskazują również na jego rolę cytoprotekcyjną, ze względu na pewne właściwości antyoksydacyjne [16,35]. NO jest cząsteczką biorącą udział w bardzo wielu procesach w organizmie m.in.:

- NO stanowi parakrynnny neurotransmitter w układzie nerwowym,
- odpowiada za rozkurczanie naczyń krwionośnych i hamowanie agregacji płytek krwi,
- stanowi jeden z mechanizmów cytotoksyczności makrofagów i komórek NK w układzie odpornościowym,
- a ponadto jest jednym z najefektywniejszych związków oczyszczających komórki z wolnych rodników oraz regulujących aktywność wielu kinaz i czynników transkrypcyjnych [13,45,51].

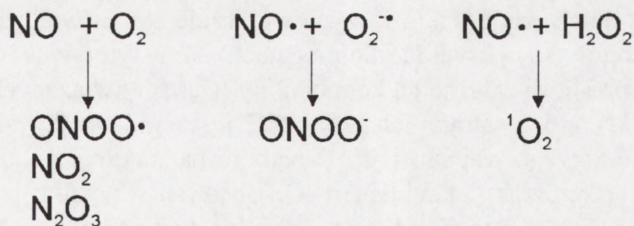
Wszystko to sprawia, że NO jest jedną z najintensywniej badanych cząsteczek, zaś w 1998 roku trzech naukowców: F. Murad, R.F. Furchgott i L.J. Ingarro otrzymało Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny za pracę nad zbadaniem ciągu przemian metabolicznych od L-argininy do NO.

2. BIOCHEMIA NO

Cząsteczka NO ma małą masę, obojętny ładunek, co w warunkach danej temperatury organizmu i stałej średniej energii kinetycznej wszystkich cząstek sprawia, że NO może szybko dyfundować w roztworach wodnych i przez spolaryzowane błony biologiczne. W stężeniach fizjologicznych (10 nM – 5 μM) czas półtrwania ($t_{1/2}$) cząsteczki NO wynosi 1–30 s. NO łatwo utlenia się w organizmie bez pomocy enzymów do azotynu NO_2^- , który następnie przechodzi w stabilny azotan NO_3^- , będący ostatecznym metabolitem NO, wydalany z organizmu [16,35]. Aktywność biologiczna NO wiąże się z obecnością w cząsteczce NO niesparowanego elektronu, który czyni NO wolnym rodnikiem (ryc. 1). NO z tlenem lub rodnikami tlenowymi tworzy reaktywne formy tlenku azotu – RNOS (ang. *reactive NO species*). W warunkach stresu, NO może reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym O_2^- , co prowadzi do powstania anionu nadtlenoazotynowego ONOO^- , który w środowisku płynu tkankowego ulega natychmiastowej protonacji do kwasu nadtlenoazotawego HOONO . Cząsteczka tego kwasu może dalej ulegać hemolitycznemu rozpadowi do rodnika wodorotlenowego OH^\cdot i rodnika dwutlenku azotu (NO_2^\cdot) lub heterolitycznemu rozpadowi do kationu nitroniowego (NO_2^+) i anionu wodorotlenowego (OH^-) [2,3,15].

Kluczowym mechanizmem regulacji procesów fizjologicznych przez NO i jego pochodne jest posttranslacyjna modyfikacja białek przez nitrację lub nitrozylację. Nitracja wiąże się z przyłączeniem grupy NO_2^+ do tyrozyny lub rzadziej tryptofanu. Nitrozylacja natomiast odnosi się do przyłączenia grupy NO^+ do metalu lub grupy tiolowej, zazwyczaj reszty cysteinowej (S-nitrozylacja).

Klasycznym przykładem regulacji funkcji białek przez NO jest bezpośrednie wiązanie się z kationami metali obecnymi w pierścieniach hemowych enzymów, np. cyklazy guanylowej, hemoglobiny czy oksydazy cytochromu c [16,35]. W wielu komórkach NO reaguje z kationem Fe^{3+} zawartym w pierścieniu hemowym cytozolowej cyklazy guanylowej (sGC), gdzie jon żelaza jest koordynacyjnie związany z pięcioma ligandami. NO aktywuje cyklazę guanylową przez utworzenie z Fe^{3+} zawartym w pierścieniu hemowym wiązania koordynacyjnego, co wymusza zmiany w strukturze przestrzennej enzymu. W rezultacie dochodzi do powstania cGMP, który z kolei aktywuje szlaki transdukcji sygnału i fosforylacji białek. Jednak nie wszystkie mechanizmy działania NO mogą być wyjaśnione za pośrednictwem szlaku zależnego od cGMP.



RYCINA 1. Produkty reakcji NO z tlenem lub reaktywnymi formami tlenu (ROS)

W warunkach fizjologicznych w obecności tlenu docelowymi grupami, z którymi oddziałuje NO i jego tlenowe pochodne, są grupy –SH. S-nitrozylacja stanowi ważną, posttranslacyjną modyfikację struktur białkowych wpływającą na funkcjonowanie białek. Przykłady obejmują aktywację lub zahamowanie enzymów, takich jak: Ras i kaspazy [17]. Szczegóły dotyczące inaktywacji enzymów efektorowych apoptozy – kaspaz przez S-nitrozylację zostaną podane poniżej.

Ciekawą cechą związków tioli i tlenku azotu jest ich względna stabilność, co czyni je znakomitymi związkami transportującymi i buforującymi tlenek azotu. Przykładowo, S-nitrozoalbumina stanowi 85% wszystkich nitrozotiooli osocza i ma, podobnie jak S-nitrozoglutation, zdolność do rozszerzania naczyń krwionośnych i hamowania agregacji płytek krwi. Ponadto, nitrozotiole wpływają na takie procesy fizjologiczne, jak immunostymulacja, mają właściwości bakteriobójcze i neuromodulacyjne [17, 24].

Co ciekawe, nitrozotiole znacznie wolniej reagują z anionorodnikiem ponadtlenkowym O_2^- niż wolny NO, co zmniejsza stężenie groźnego produktu tych reakcji – anionu nadtlenoazotynowego $ONOO^-$. Niskie stężenie nadtlenoazotynów jest więc korzystne dla całego organizmu, gdyż chroni przed uszkodzeniem białek, lipidów i DNA. Anion nadtlenoazotynowy z łatwością nitruje reszty tyrozyny w białkach, zaś nitracja reszt tyrozyny może regulować funkcjonowanie białek poprzez zahamowanie fosforylacji tyrozyny [7]. Ponadto, anion nadazotynowy uszkadza zasady azotowe w DNA, powodując ich utlenianie i nitrozowanie, co może być przyczyną zmian genetycznych, czyli mutacji, o ile nie zostaną one naprawione przez systemy naprawcze DNA w komórce [10].

3. SYNTAZY TLENKU AZOTU

Endogenny tlenek azotu jest produkowany w organizmie z L-argininy przez syntazę tlenku azotu (NOS) w reakcji:



Znane są 3 izoformy syntazy tlenku azotu: neuronalna (nNOS), endotelialna (eNOS) i indukowalna (iNOS) [5,14]. nNOS ulega stałej, konstytutywnej ekspresji w mózgu, ale również w komórkach mięśni szkieletowych, natomiast konstytutywną ekspresję eNOS odkryto w komórkach śródbłonna naczyniowego, ale też w wielu innych komórkach (monocytach, płytkach krwi, kardiomiocytach). Konstytutywne nNOS i eNOS ulegają stałej ekspresji, są zależne od kalmoduliny (CaM) i związanych z nią jonów wapnia (Ca^{2+}/CaM), a tym samym ich aktywność jest regulowana wzrostem poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia ($[Ca^{2+}]_i$) bądź to na wskutek pobudzenia receptorów NMDA neuronów przez glutaminian (nNOS), bądź też w wyniku działania cyklu fosfoinozytoloowego, aktywowanego przez receptory muskarynowe stymulowane acetylocholiną (eNOS). Indukowalna syntaza tlenku azotu (iNOS) ulega ekspresji głównie w makrofagach, komórkach Kupfera, hepatocytach pod wpływem bodźców

zapalnych lub stymulacji immunologicznej, a zatem nie jest obecna w wymienionych komórkach, dopóki nie zajdzie ekspresja ich genów w wyniku oddziaływania LPS-u, IFN- γ , IL-1 czy TNF- α [5,14]. Wielu autorów wskazuje również na istnienie czwartej izoformy syntazy tlenku azotu – mitochondrialnej syntazy tlenku azotu (mtNOS), chociaż jej pochodzenie i rola nie zostały do końca wyjaśnione. Wiele prac wskazuje na to, że mtNOS stanowi produkt alternatywnego składowania nNOS [19,23]. W przeciwieństwie jednak do nNOS, mtNOS podlega odmiennym modyfikacjom posttranslacyjnym: acylacji odmiennej od acylacji eNOS oraz fosforylacji na C-końcu [19]. Dzięki obecności mtNOS, zlokalizowanej w wewnętrznej błonie mitochondriów możliwa jest konstytutywna produkcja NO w mitochondriach. NO w mitochondriach stanowi regulator oddychania mitochondrialnego. Wiąże się on z oksydazą cytochromu c (kompleks IV) – ostatnim enzymem łańcucha oddechowego – i kompetytywnie hamuje go, zaś tego rodzaju inhibicja jest odwracalna [20,42,46]. Rola mitochondrialnej produkcji NO wiąże się z regulacją intensywności oddychania mitochondrialnego, zwłaszcza w odniesieniu do komórek znajdujących się daleko od naczyń włosowatych. Komórki znajdujące się najbliżej naczyń krwionośnych zazwyczaj otrzymują najwięcej O_2 oraz L-argininy, co stymuluje mtNOS oraz produkcję NO. NO z kolei oddziałując z oksydazą cytochromową zmniejsza zużycie O_2 , co pozwala na dalszą dyfuzję O_2 w tkankach [20,42,46,53].

4. APOPTOZA

Apoptoza, inaczej programowana śmierć komórki, odgrywa istotną rolę w przebiegu prawidłowego rozwoju embrionalnego, utrzymaniu homeostazy organizmów wielokomórkowych oraz jest niezbędna w regulacji procesów, takich jak selekcja negatywna auto-reaktywnych limfocytów T w grasicy, jak również usuwanie dojrzałych autoreaktywnych limfocytów T na obwodzie. Supresja procesu śmierci komórkowej może prowadzić do rozwoju nowotworów, chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych. Uruchomienie procesu apoptozy związane jest z działaniem na komórkę czynników uszkodzających i niemożnością naprawy powstałych uszkodzeń. Komórki podlegające apoptozie wykazują szereg charakterystycznych zmian morfologicznych, w tym pączkowanie błony komórkowej, zmniejszenie objętości komórki, kondensację jądra komórkowego oraz tworzenie się, związanych z błoną komórkową, ciałek apoptotycznych, które są szybko pochłaniane i fagocytowane przez sąsiadujące, zdrowe komórki. Zapobiega to uwolnieniu zawartości komórki i rozwojowi zapalenia [43,47]. Aktywnej, wymagającej energii śmierci komórkowej towarzyszy również fragmentacja DNA, proteoliza białek komórkowych, spadek transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) oraz zaburzenia asymetrii błony komórkowej [43].

Molekularny mechanizm apoptozy zależny jest od stałej obecności w komórce białek zdolnych do inicjacji i transdukcji sygnału śmierci, jak również białek bezpośrednio biorących udział w fazie wykonawczej PCD. Czynniki inicjujące działanie maszyny śmierci komórkowej można podzielić na trzy grupy:

- (1) prowadzące do aktywacji tzw. receptorów śmierci,
- (2) stanowiące zawartość granulosomów komórek cytotoksycznych oraz
- (3) uszkadzające bezpośrednio lub będące pośrednim źródłem stresu komórkowego, jak np. związki cytotoksyczne czy też promieniowanie jonizujące lub ultrafioletowe [43, 47].

5. NO JAKO CZYNNIK INDUKUJĄCY APOPTOZĘ

Apoptoza indukowana NO odgrywa ważną rolę w dwóch rodzajach procesów:

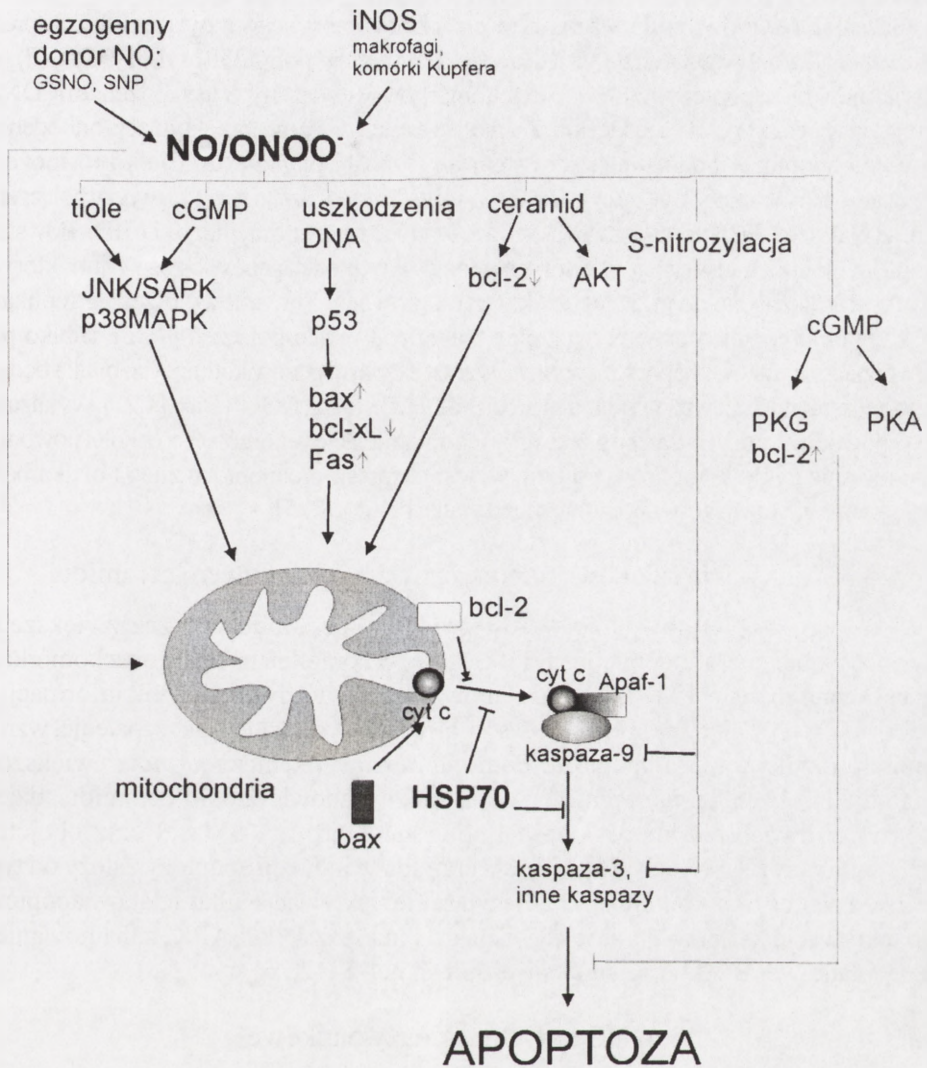
(i) w mechanizmach cytotoksyczności przeciwko komórkom nowotworowym i patogenom,

(ii) w wielu procesach zapalnych, niedokrwienych i neurodegeneracyjnych, gdzie NO jest bezpośrednią przyczyną niszczenia komórek i tkanek [4,41].

Indukcję apoptozy przez NO wiąże się głównie z aktywacją mitochondrialnego szlaku apoptozy, wiążącego się z uwolnieniem cytochromu c z mitochondrium na skutek utraty potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$) (ryc. 2) [48]. Uwolniony cytochrom c działa jako kofaktor dla zależnego od dATP/ATP czynnika aktywującego proteazę-1 – Apaf-1 (*dATP/ATP dependent apoptotic protease activating factor-1*), który tworzy wraz z prokaspazą-9 kompleks, zwany apoptosomem. W dalszej kolejności białko Apaf-1 zmienia swoją konformację przestrzenną, co umożliwia wiązanie N-końcowej części jego domeny CARD (*caspase-recruiting domain*) z obszarem CARD prokaspazy-9 [6,29]. Oddziaływanie to prowadzi do aktywacji prokaspazy-9, która proteolitycznie tnie kaspazę-3, również związaną z apoptosomem. Wprawdzie mechanizm indukcji wpływu cytochromu-c z mitochondriów nie został dokładnie poznany, ale wiadomo, że biorą w nim udział pro-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2: Bax, Bak, Bad, Bik i Noxa [6,29]. Innym białkiem mitochondrialnym uwalnianym podczas apoptozy jest Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP) - binding protein with low pI*), który jest dimerem wiążącym i neutralizującym hamujące działanie IAP. Prowadzi to do bardziej wydajnej aktywacji kaspazy-3 przy udziale apoptosomu [50].

5.1. Aktywacja mitochondrialnego szlaku apoptozy

Tlenek azotu może indukować apoptozę wpływając na uwalnianie cytochromu c z mitochondrium. Niskie stężenia NO odwracalnie hamują oksydazę cytochromu (kompleks IV) współzawodnicząc z tlenem, co prowadzi do wzrostu produkcji H_2O_2 i O_2 [42,46]. W rezultacie powstający rodnik tlenowy – O_2^- oddziałuje z NO tworząc $ONOO^-$. Zarówno anionorodnik ponadtlenkowy, jak i $ONOO^-$ mogą powodować degradację fosfolipidu – kardiolipiny, co prowadzi do nieodwracalnego zatrzymania łańcucha oddechowego i apoptozy. Cytochrom c pozostaje normalnie związany z kardiolipiną na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, zaś jego peroksydacja przez $ONOO^-$ lub O_2^- prowadzi do uwolnienia cytochromu c [20,49]. Niektórzy autorzy wskazują również na rolę peroksydacji innych lipidów mitochondrialnych w indukcji apoptozy, jednak brak jest dowodów bezpośrednich [39].



RYCINA 2. Pro- i antyapoptotyczne szlaki uruchamiane przez NO

5.2. Indukcja uszkodzeń DNA oraz ekspresji białka p53

Rodniki tlenowe (ROS) oraz reaktywne pochodne tlenku azotu (RNOS) mogą prowadzić do uszkodzenia DNA, w efekcie końcowym indukując apoptozę komórki w odpowiedzi na nieodwracalne uszkodzenie materiału genetycznego. Istnieją trzy mechanizmy, za pośrednictwem których NO może uszkadzać DNA (ryc. 2). Pierwszy mechanizm obejmuje bezpośrednią reakcję ONOO⁻ z DNA, drugi zahamowanie procesów naprawczych, zaś trzeci wiąże się ze zwiększoną produkcją czynników alkilujących oraz anionorodnika ponadtlenkowego [10]. W środowisku beztlenowym, RNOS powodują jednoniciowe uszkodzenia DNA, jak również deaminacje cytozyny, adeniny i guaniny [10,35].

Uszkodzenie DNA prowadzi do włączenia mechanizmów naprawczych związanych z ekspresją białka p53 oraz aktywacją enzymu jądrowego polimerazy poli(ADP) rybozy (PARP), co sprzyja indukcji apoptozy [31,44]. Stres komórkowy, związany z uszkodzeniami DNA, zazwyczaj w postaci pęknięć jednej lub obu nici, stres oksydacyjny oraz aktywacja onkogenów powodują apoptozę indukowaną wzrostem aktywności białka p53. Białko to może w odwracalny sposób zatrzymywać cykl komórkowy w fazie G1, dzięki temu że tworzy połączenia m.in. z białkiem TBF, będącym składową czynnika transkrypcyjnego TFIID. Powstały kompleks blokuje transkrypcję niektórych genów w tym onkogenów c-fos i c-jun, których produkty są niezbędne do przebiegu cyklu komórkowego. Prawidłowy przebieg replikacji DNA w komórce uniemożliwia tworzenie białka p53 takich połączeń [4,22]. Białko p53 może ponadto indukować apoptozę poprzez wzrost ekspresji genów kodujących białka będące bezpośrednimi wykonawcami szlaku śmierci: Fas, FasL, DR5, DcR1 i Bax [4,22]. Wykazano, że NO powoduje wzrost ekspresji białka p53 i jego akumulację w komórce, co z kolei powoduje zahamowanie cyklu komórkowego oraz wzrost ekspresji proapoptotycznego białka bax i zmniejszenie ekspresji anti-apoptotycznego białka bcl-2 [21,25].

5.3. Aktywacja szlaków apoptotycznych pod wpływem ceramidu

Wykazano, że NO powoduje wzrost produkcji ceramidu poprzez zwiększenie aktywności obojętnej sfingomielinazy (N-SMase) w komórkach HL-60 oraz komórkach kłębuszka nerkowego [26]. Ceramid stanowi ważny wtórny przekaźnik informacji w komórkach, wpływający na szereg procesów biologicznych, takich jak: zapalenie, wzrost komórek, różnicowanie i apoptoza. Pomimo możliwej syntezy *de novo*, większość sfingomielin obecnych na terenie komórki może stanowić źródło ceramidu dzięki aktywności dwóch enzymów: kwaśnej sfingomielinazy (A-SMase) oraz obojętnej sfingomielinazy (N-SMase) [26]. Udział ceramidu w indukcji apoptozy zależy od typu badanych tkanek oraz komórek [12,26] i wiąże się z aktywacją kilku szlaków apoptozy, m.in. aktywacją kaspazy-9 i -3, aktywacją szlaku kinaz JNK/SAPK, zahamowaniem kinazy białkowej B/Akt oraz supresją ekspresji bcl-2 [12,26] (ryc. 2).

5.4. NO aktywuje kinazy białkowe

Apoptoza indukowana przez NO wiąże się z aktywacją szeregu kinaz białkowych serynowo-treoninowych – MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), w zależności od zastosowanego donora NO oraz rodzaju badanych komórek. MAP kinazy są aktywowane w odpowiedzi na stymulację receptorów sprzęgniętych z białkami G oraz aktywację białek G. Aktywacja „małego białka G” – białka Ras prowadzi do aktywacji kaskady kinaz MAP, które fosforylują i regulują aktywność kolejnych kinaz MAP na szlaku przekazywania sygnału oraz enzymów i czynników transkrypcyjnych (m.in. c-Jun, CREB), wpływających na ekspresję wielu genów (ryc. 2) [11,41,45].

Wykazano, że NO może aktywować kinazy MAP, takie jak: JNK (*c-Jun N terminal kinase*)/SAPK (*stress-activated protein kinase*) oraz p38 MAPK, biorące udział w indukcji apoptozy [11,41,45]. Atenuacja kinazy JNK/SAPK za pomocą antysensowych nukleotydów hamowała apoptozę oraz akumulację białka p53 po podaniu S-nitrozoglutationu komórkom RAW 264.7 [27,28]. W podobny sposób wykazano, że w komórkach RAW 264.7

poddawanych działaniu donorów SNP (nitroprusydku sodu) lub S-nitrozoglutationu, nadekspresja kinazy białkowej C (PKC) chroniła komórki przed indukcją apoptozy przez NO [8]. W komórkach HL-60, apoptoza indukowana przez SNP była blokowana przez inhibitor kinazy p38, SB203580 [28]. W komórkach neuronalnych SH-SY5Y donor jonu nadazotynowego, SIN-1 indukował fosforylację kinazy p38 MAPK oraz kinazy ERK (*extracellular signal-related kinase*), prowadzącą do aktywacji kaspazy 3 oraz fragmentacji DNA [40].

6. ANTY-APOPTOTYCZNE DZIAŁANIE NO

Chociaż NO może w pewnych warunkach oraz w pewnych komórkach indukować apoptozę, to jednak w wielu badaniach udało się wykazać, że w niskich stężeniach NO ma działanie cytoprotekcyjne. Podłoże biochemiczne antyapoptotycznego działania NO wiąże się z uruchomieniem szeregu komórkowo-specyficznych szlaków transdukcji sygnału, z których najważniejszym szlakiem wydaje się obecnie być szlak zależny od cGMP. Ogólnie, antyapoptotyczne działanie NO możemy podzielić na mechanizmy zależne i niezależne od cGMP (ryc. 2). NO może również bezpośrednio wpływać na aktywność enzymów biorących udział w apoptozie poprzez S-nitrozylację.

6.1. Efekty ochronne zależne od cGMP

Jak wspomniano powyżej, związanie NO z hemem obecnym w cyklicznej guanylowej prowadzi do aktywacji enzymu i produkcji cGMP. Mechanizmy działania cGMP można naśladować za pomocą 8-bromo-cGMP, analogu cGMP, zaś dodanie 1-*H*-oksodiazolo-4,3- α chinoksalino-1-onu (ODQ) prowadzi do zahamowania tych szlaków. Efekt działania NO za pośrednictwem cGMP może mieć charakter zarówno cytoprotekcyjny, jak i prowadzący do indukcji apoptozy, w zależności od typu komórek [45]. Wykazano, że cGMP chroni przed apoptozą komórki nerwowe, hepatocyty i limfocyty [41,45]. W hepatocytach apoptoza indukowana przez TNF- α oraz aktywność kaspazy-3 ulegała redukcji przy ekspozycji na 8-bromo-GMP, zaś użycie KT5823 – inhibitora kinazy białkowej G (PKG), zależnej od cGMP znosiło ochronny charakter analogu cGMP. Supresja aktywności kaspazy-3 w hepatocytach ekspozowanych na NO była częściowo blokowana przez ODQ [25]. Kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów są aktywne tylko w niektórych typach komórek. W szczurzych komórkach mięśniówki gładkiej naczyń, 8-bromo-cGMP oraz S-nitrozoglutation indukowały apoptozę w komórkach zakażonych adenowirusem z genem dla PKG. Do apoptozy nie dochodziło ani w komórkach zakażonych, ani niezakażonych adenowirusem i dopiero zmiana poziomu PKG zmieniała wrażliwość tych komórek na NO oraz cGMP [9].

Zahamowanie PKA za pomocą specyficznego inhibitora KT5720 w komórkach hepatocytów blokowało ochronny efekt cGMP, ale jedynie częściowo, zaś cykliczny AMP i cGMP modulowały apoptozę indukowaną przez TNF- α w sposób zależny i niezależny od PKA [33].

Inną drogą ochronną zależną od cGMP jest hamowanie przez NO apoptozy indukowanej przez produkcję ceramidu. W ludzkich monocytach U937 egzogeny NO hamuje apoptozę indukowaną przez TNF- α i uwalnianie ceramidu, zaś ochronny efekt NO działa za pośrednictwem szlaku zależnego od cGMP [3].

Ochronny efekt cGMP może być również indukowany poprzez wzrost ekspresji białek z rodziny bcl-2 (ryc. 2). Wspomniana rodzina białek bcl-2 jest bezpośrednio zaangażowana w utrzymanie integralności mitochondriów. Do chwili obecnej w obrębie tej rodziny zidentyfikowano 18 białek o działaniu zarówno pro-, jak i anty-apoptotycznym. Większość anty-apoptotycznych białek z rodziny bcl-2 zawiera C-kończącą domenę hydrofobową, która umożliwia ich zakotwiczenie w błonie mitochondrialnej, w błonie jądrowej oraz w siateczce śródplazmatycznej. Białka bcl-2 i bcl-X_L działają jako „strażnicy” mitochondrium, hamując uwalnianie cytochromu c i przeciwdziałając kaskadowej aktywacji kaspaz. Pro-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 (Bid, Bax, Bal, Bim i Noxa) są zlokalizowane głównie w cytoplazmie lub są związane z białkami cytoszkieletu. Po zadziałaniu czynników apoptotycznych białka te ulegają translokacji do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie spełniają swoją rolę [29, 43].

NO zapobiega spadkowi ekspresji białka bcl-2 oraz mRNA w komórkach limfocytów B [18]. NO może również zmieniać poziom ekspresji bcl-2 i bax indukując czynnik transkrypcyjny p53. NO podany myszom „knock-out” dla genu iNOS zmniejszało poziom p53, co z kolei zmniejszało poziom ekspresji pro-apoptotycznego bax oraz zwiększało ekspresję anty-apoptotycznego bcl-2 i bcl-xl. Zmiana stosunku ekspresji bax i bcl-2 w obecności NO może mieć znaczący wpływ na przebieg apoptozy [30].

6.3. Zmiany ekspresji białek szoku cieplnego

NO indukuje również ekspresję białek o charakterze cytoprotekcyjnym, zwanych białkami szoku cieplnego – hsp (*heat shock proteins*) (ryc. 2). Cytokiny indukują ekspresję hsp 70 w drodze zależnej od NO i chronią komórki wysepek trzustkowych przed apoptozą, jednak nie indukują ekspresji hsp 70 w myszach z „knock-out” genu iNOS [34]. Mechanizm molekularny związany z tym procesem ma prawdopodobnie dwa podłoża: hsp70 hamuje oligomeryzację Apaf-1, wiążąc się z domeną rekrutującą kaspazy – CARD (*caspase-recruiting domain*), co prowadzi do wstrzymania tworzenia się apoptosomu [1] lub hsp70 pośredniczy, jako białko opiekuńcze, w transporcie białek do mitochondrium, hamując uwalnianie cytochromu c [37]. Hsp90 oddziałuje również na samą produkcję NO przez eNOS i iNOS. Wykazano, że hsp90 działa jako allosteryczny aktywator eNOS, zwiększając aktywność eNOS poprzez wzmocnienie wiązania się kalmoduliny. W przypadku iNOS wykazano jedynie zdolność hsp90 do zwiększania produkcji NO, zaś dokładny mechanizm tego oddziaływania nie jest do końca poznany [52].

Ponadto, w ludzkich komórkach endotelialnych oraz komórkach COS-7 wykazano, że hsp 70 może wpływać bezpośrednio na produkcję cGMP, wiążąc się z cytozoolową cyklazą guanylową [2], co świadczy o nowej, niezbadanej dotychczas roli hsp70 w regulacji szlaków zależnych od cGMP.

6.4. NO hamuje kaspazy w drodze S-nitrozylacji

Kaspazy stanowią rodzinę proteaz cytoplazmatycznych, składającą się z 14 izoform, które funkcjonalnie można podzielić na biorące udział w apoptozie (kaspaza -2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10) oraz takie, których najważniejszą rolą jest udział w aktywacji cytokin (kaspaza -1, -4, -5 i -11). Niewiele wiadomo o roli kaspazy -12, -13 i -14. Kaspazy są syntetyzowane jako zymogeny, a sygnał apoptotyczny powoduje konwersję prekursorów do aktywnych enzymów, indukowaną oligomeryzacją. Jak większość białek, kaspazy również podlegają modyfikacjom postranslacyjnym, zmieniającym ich aktywność. Jednym z głównych rodzajów modyfikacji kaspaz jest fosforylacja zazwyczaj związana z supresją apoptozy mediowaną przez receptory czynników wzrostowych [43,50].

Innym sposobem post-translacyjnej modyfikacji kaspaz jest S-nitrozylacja. NO jest cząsteczką obojętną i wykazuje słabą reaktywność z grupami tiolowymi w pH neutralnym, natomiast pochodna NO – ONOO⁻ reaguje z grupami tiolowymi tysiąc razy szybciej niż sam NO. Wykazano, że miejsca aktywne kaspazy-1, -2, -3, -4, -6, -7 i -8 ulegają odwracalnej S-nitrozylacji, zaś indukcja apoptozy w drodze Fas/FasL prowadzi do denitrozylacji kaspazy 3 (ryc. 2) [17,32,36]. Denitrozylacja zwiększa aktywność kaspazy-3, choć nie wpływa na obróbkę prokaspazy-3. Szlak wiodący do denitrozylacji nie został dotychczas w pełni poznany, jednak uważa się, że nitrozylacja i denitrozylacja stale towarzyszą apoptozie [32,36]. Zdolność NO do S-nitrozylacji kaspaz będzie zależała od dostępności NO oraz O₂⁻ i innych związków zawierających grupy tiolowe, takich jak: glutation czy wolna cysteina.

7. ZNACZENIE ROLI TLENKU AZOTU W INDUKCJI APOPTOZY ORAZ PRZEŻYWANIU KOMÓREK

Utrzymanie homeostazy jest możliwe dzięki zachowaniu równowagi pomiędzy podziałem komórek a ich śmiercią. Zaburzenie tej równowagi ma związek z patogenezą szeregu chorób, zaś NO może wpływać na kierunek równowagi, indukując lub hamując apoptozę. Przykładowo, apoptoza za pośrednictwem NO może pogarszać funkcjonowanie narządów, prowadząc do m.in. miażdżycy naczyń oraz chorób neurodegeneracyjnych. Z drugiej strony, odpowiednie ilości NO mogą hamować niepożądaną apoptozę, jaka ma miejsce w przypadku niewydolności wątroby podczas sepsy, oraz uszkodzenia komórek endotelialnych (miażdżycy i przerost intymy) czy komórek neuronalnych wskutek niedotlenienia. Z drugiej strony antyapoptotyczne działanie NO w stosunku do komórek z uszkodzonym DNA, które powinny zginąć w wyniku aktywacji szlaków apoptotycznych, może prowadzić do rozwoju nowotworów. NO wydaje się mieć duże znaczenie w patogenezie chorób zakaźnych. Przykładowo, NO produkowany w zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis* ma na celu zabicie makrofagów zakażonych prątkami, jednak jednocześnie może powodować apoptozę limfocytów T odpowiedzialnych za rozwój odpowiedzi immunologicznej przeciwko zakażeniu prątkami [38].

Tym samym, regulacja produkcji NO stanowi cenne potencjalne narzędzie terapeutyczne, które można wykorzystać w terapii chorób, w przypadku których mamy do czynienia ze zmienionym poziomem indukcji apoptozy i/lub tlenku azotu.

LITERATURA

- [1] AYMAN S, BALKIR SMS, ROBBINS PD, ALNEMRI ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 476–483.
- [2] BALASHOVA N, CHANG FJ, LAMOTHE M, SUN Q, BEUVE A. Characterization of a novel type of endogenous activator of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 2005; **280**: 2186–2196.
- [3] BARSACCHI RC, SESTILI P, CANTONI O, MONCADA S, CLEMENTI E. Cyclic GMP-dependent inhibition of acid sphingomyelinase by nitric oxide: an early step in protection against apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **9**: 1248–1255.
- [4] BLAISE GA, GANGAL M, AUTHIER S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005; **208**: 177–192.
- [5] BREDT D, SNYDER S. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 682–685.
- [6] BRENNER C, LE BRAS M, KROEMER G. Insights into the mitochondrial signaling pathway: what lessons for chemotherapy? *J Clin Immunol* 2003; **23**: 73–80.
- [7] BRITO C, NAVILIAT M, TISCORNIA AC, VUILLIER F, GUALCO G, DIGHIERO G, RADI R, CAYOTA AM. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 1999; **162**: 3356–3366.
- [8] CALLSEN D. Role of mitogen-activated protein kinases in S-nitrosoglutathione-induced macrophage apoptosis. *Biochemistry* 1999; **38**: 2279–2286.
- [9] CHICHE JD, SCHLUTSMEYER SM, BLOCH DB, DE LA MONTE SM, ROBERTS JD, FILIPPOV G, JANSSENS SP, ROSENZWEIG A, BLOCH KD. Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *J Biol Chem* 1999; **273**: 34263–34271.
- [10] CROW JP. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. *Adv Exp Med Biol* 1996; **387**: 147–161.
- [11] DAVIS R. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14553–14556.
- [12] Di NARDO A, BENASSI L, MAGNONI C, COSSARIZZA A, SEIDENARI S, GIANNETTI A. Ceramide 2 (N-acetyl sphingosine) is associated with reduction in Bcl-2 protein levels by Western blotting and with apoptosis in cultured human keratinocytes. *Brit J Dermatol* 2002; **143**: 491–497.
- [13] DUNCAN AJ. Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* 2004; **26**: 67–96.
- [14] ELFERING SL, SARKELA TM, GIULIVI C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002; **277**: 38079–38086.
- [15] ESPEY MG, DOUGLAS TD, SANDHYA X., CITRIN D, VITEK MP, WINK DA. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann NY Acad Sci* 2002; **962**: 195–206.
- [16] FUKUTO JM, SWITZER CH, MIRANDA KM, WINK DA. Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 335–355.
- [17] GASTON BM, CARVER J, DOCTOR A, PALMER LA. S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv* 2003; **3**: 253–263.
- [18] GENARO AM, ALVAREZ A, MARTÍNEZ C, BOSCA L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1884–890.
- [19] GHAFOURIFAR PC. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005; **26**: 190–195.
- [20] GIULIVI C, PODEROSO JJ, BOVERIS A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11038–11043.

- [21] GORDON SA, ABOU-JAOUDE W, HOFFMAN RA, MCCARTHY SA, KIM YM, ZHOU X, ZHANG XR, SIMMONS RL, CHEN Y, SCHALL L, FORD HR. Nitric oxide induces murine thymocyte apoptosis by oxidative injury and a p53-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 2001; **70**: 87–95.
- [22] HARRIS SL, LEVINE AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; **24**: 2899–2908.
- [23] HAYNES V, ELFERING SL, SQUIRES RJ, TRAASETH N, SOLIEN J, ETTL A, GIULVIC. Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in Pathophysiology. *IUBMB Life* 2003; **55**: 599–603.
- [24] HESS DT, M. A., KIM SO, MARSHALL HE, STAMLER JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 150–166.
- [25] HORTELANO SH, HIRSCH N, SUSIN T, SANTOS AM, BOSCA I, KROEMER LG. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Letters* 1997; **410**: 373–377.
- [26] HUWILER A, PFEILSCHIFTER J, van den BOSCH H. Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 7190–7195.
- [27] JUN CD, OH CD, KWAK HJ, PAE HO, YOO JC, CHOI BM, CHUN JS, PARK RK, CHUNG HT. Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase, p38 Kinase, and CPP-32 protease pathways. *J Immunol* 1999; **162**: 3395–3401.
- [28] JUN CD, KWAK HJ, YOO JC, CHOI BM, OH CD, CHUN JS, PAIK SG, PARK YH, CHUNG HT. Modulation of nitric oxide-induced apoptotic death of HL-60 cells by protein kinase C and protein kinase A through mitogen-activated protein kinases and CPP32-like protease pathways. *Cell Immunol* 1999; **194**: 36–46.
- [29] KIM R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **333**: 336–343.
- [30] KOGLIN J, GRANVILLE DJ, GLYSING-JENSEN T, MUDGETT JS, CARTHY CM, McMANUS BM, RUSSELL ME. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2^{-/-} recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation* 1999; **99**: 836–842.
- [31] LAVAL F, LAVAL WD. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997; **131**: 175–191.
- [32] LI J, TALANIAN RV, KIM YM. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 419–424.
- [33] LI J, YANG S, BILLIAR TR. Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 13026–13034.
- [34] LIU D, PAVLOVIC D, CHEN M, FLODSTROM M, SANDLER S, EIZIRIK D. Cytokines induce apoptosis in beta-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}). *Diabetes* 2000; **49**: 1116–1122.
- [35] MANCARDI D, THOMAS DD, KATORI T, TOCCHETTI CG, ESPEY MG, MIRANDA KM, PAOLOCCINI N, WINK DA. The chemical dynamics of NO and reactive nitrogen oxides: a practical guide. *Curr Mol Med* 2004; **4**: 723–740.
- [36] MANNICK JB, LIU L, HESS DT, ZENG M, MIAO QX, KANE LS, GOW AJ, STAMLER JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999; **284**: 651–654.
- [37] MOSSER DD, CARON AW, BOURGET L, MERIIN AB, SHERMAN MY, MORIMOTO RI, MASSIE B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 7146–7159.
- [38] NATHAN C, SHILOH MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8841–8848.
- [39] NOMURA K, IMAI H, KOUMURA T, ARAI M, NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29294–29302.
- [40] OH-HASHI K, MARUYAMA W, YI H, TAKAHASHI T, NAOI M, ISOBE K. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **24**: 504–509.
- [41] PILZ RB. Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front Biosci* 2005; **1**: 1239–1268.
- [42] RADI R, CASSINA A, HODARA R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002; **383**: 401–409.

- [43] RATHMELL JC, THOMPSON CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1999; **17**: 781–828.
- [44] RICH T, ALLEN RL, WYLLIE AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; **407**: 777–783.
- [45] RUSSWURM M. Guanylyl cyclase: NO hits its target. *Biochem Soc Symp* 2004; **71**: 51–63.
- [46] SARTI P, ARESE M, BACCHI A, BARONE MC, FORTE E, MASTRONICOLA D, BRUNORI M, GIUFFRÈ A. Nitric oxide and mitochondrial complex IV. *IUBMB Life* 2003; **55**: 605–611.
- [47] SAVILL J, FADOK V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; **407**: 784–788.
- [48] SCAFFIDI CF, SRINIVASAN A, FRIESEN C, LI F, TOMASELLI KJ, DEBATIN KM, KRAMMER PH, PETER ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; **17**: 1675–1687.
- [49] SHIDOJI YH, KOMURA S, OHISHI N, YAGI K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 343–347.
- [50] SHIOZAKI EN. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 2004; **29**: 486–494.
- [51] WINK DA, MIRANDA KM, ESPEY MG. Cytotoxicity related to oxidative and nitrosative stress by nitric oxide. *Exp Biol Med* 2001; **226**: 621–623.
- [52] YOSHIDA M, XIA YJ. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 36953–36958.
- [53] XU WCI, MONCADA S. Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Res* 2005; **15**: 63–65.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 07.09.2005 r.

Przyjęto: 10.10.2005 r.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

GRA W RĘKĘ

SLEIGHT OF HAND

Przemko TYLZANOWSKI

Lab of Skeletal Development and Joint Disorders, University of Leuven, Belgium

Streszczenie: Rozwijające się kończyny kręgowców są powszechnie używanym modelem doświadczalnym do badania mechanizmów różnicowania tkankowego. Metody badawcze oparte na nowoczesnych technikach genetycznych i molekularnych pozwoliły na powtórne przeanalizowanie, i czasami podważenie, długo istniejących hipotez dotyczących rozwoju kończyn u kręgowców. Jedną z nich dotyczy mechanizmu różnicowania się kończyny wzdłuż osi proksymalno-dystalnej (P-D), opartej na obecności tak zwanej Strefy Rozwoju. Wyniki ostatnich badań sugerują inny model różnicowania się wzdłuż tej osi, oparty na tak zwanej predeterminacji. Nowe doświadczenia wykazały też nieoczekiwaną rolę, jaką szlak regulowany przez *Sonic hedgehog* (*Shh*) odgrywa w określaniu ilości i tożsamości palców. Wyniki tych prac są dyskutowane w tym artykule.

Słowa kluczowe: embriologia, rozwój kończyn, czynnik wzrostu fibroblastów, Fgf, Shh, Wnt, palce, różnicowanie tkankowe.

Summary: Developing vertebrate limb is a model system frequently used to study tissue differentiation and patterning. Research methods based on sophisticated genetic and molecular embryology techniques allowed revising some of the longstanding hypotheses in this field of research. One of them proposed the mechanism of limb development along proximal-distal axis based on the existence of Progress Zone. Recent results propose an alternative model of limb differentiation along this axis, so called Predetermination Model. Additionally, an unexpected function of sonic hedgehog in the determination of digit number and identity was recently proposed. Some of those findings will be discussed in this article.

Keywords: embryology, limb development, Fgf, Shh, Wnt, digits, patterning.

Lista skrótów: **AER** (*Apical Ectodermal Ridge*) – szczytowy grzebień ektodermalny; **AP** – oś anteryjno-posteryjna; **BMP** (*Bone Morphogenetic Protein*) – morfogenetyczne białko kości; **dpc** (*days post coitus*) – dni po zapłodnieniu; **DV** – oś dorsalno-wentralna; **Fgf** (*Fibroblast Growth Factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; **PD** – oś proksymalno-dystalna; **PTH** (*Parathyroid Hormone*) – parathormon; **PZ** (*Progress Zone*) – strefa postępu; **Shh** (*Sonic hedgehog*) – stadium HH – stadium rozwoju zarodka kury według Hamburgera i Hamiltona; **TGFβ** – (*Transforming Growth Factor beta*) – transformujący czynnik wzrostu beta; **ZPA** (*zone of polarizing activity*) – strefa polaryzującej aktywności.

WSTĘP

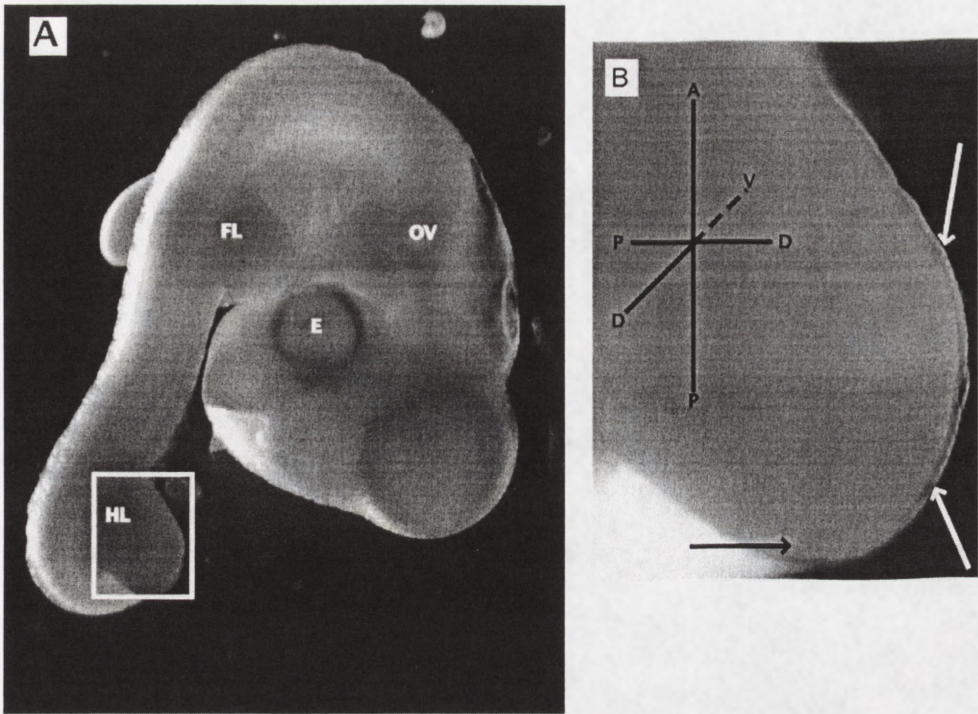
Proces rozwoju embrionalnego jest przedmiotem badań od wielu dekad, a nawet wieków [3]. Pionierskie doświadczenia zostały przeprowadzone przez Spemanna i Mangolda, którzy używając techniki przeszepów, wykazali obecność centrów organizacyjnych w rozwijających się zarodkach żab [33]. Centra te dostarczają wydzielanych białek, które wpływają na otaczające je komórki regulując ich proliferację i różnicowanie. Potrzeba było dodatkowych 50 lat, aby te bardzo ważne odkrycia zostały przeanalizowane na poziomie molekularnym. Jedną z interesujących konsekwencji tej pracy było uświadomienie sobie, że takie centra sygnalizacyjne nie tylko istnieją u organizmów innych niż żaby, ale pozostają aktywne w czasie późniejszych etapów rozwoju organizując inne „mniejsze” struktury, takie jak: serce, nerki czy kończyny.

W wyniku nagromadzenia większej ilości molekularnych i genetycznych danych okazało się, że tylko kilka sygnalizacyjnych szlaków jest wielokrotnie używanych poprzez rozwój embrionalny. Oddziałują one na siebie poprzez czasami bardzo skomplikowane sieci powiązań uformowane w tych centrach sygnalizacyjnych. Większość z tych szlaków jest regulowana przez ligandy należące do jednej z następujących rodzin białek: Wnt, TGF β /BMP, Fgfs, Hedghogs, Notch i/lub hormonów (steroidowych, parathormon – PTH, kwas retinowy) [44].

Istnieje wiele systemów doświadczalnych używanych w badaniach molekularnych i genetycznych podstaw regulujących indukcję tkanek i ich różnicowanie. Jednym z bardziej popularnych modeli doświadczalnych są rozwijające się kończyny kręgowców [40]. Dla uproszczenia, w tym artykule kończyny przednie i tylne będą nazywane kończynami, chyba że zaznaczono inaczej.

Rozwój kończyny zaczyna być morfologicznie widoczny u myszy około 9,5 dnia po zapłodnieniu (ang. *days post coitum* – dpc), a u kurczaka po około trzech dniach (ryc. 1A). Proces ten rozpoczyna się od tworzenia zawiązka kończyny składającego się z komórek mezenchymalnych pochodzących z płytki bocznej mezodermy otoczonych ektoderma. Podczas indukcji kończyny, ektoderma grubieje i tworzy strukturę zwaną ektodermalnym grzebieniem szczytowym – AER (*Apical Ectodermal Ridge*). Potem kończyna kontynuuje wzrost tworząc stylopodium (ramię do łokcia), zygotopodium (łokieć do nadgarstka) i autopodium (dłoń) (ryc. 2). Jako w pełni uformowana, kończyna staje się skomplikowanym organem składającym się z licznych tkanek i struktur, niektórych powstałych lokalnie (kość i chrząstka), a niektórych takich, które przywędrowały do kończyny ze sklerotomu (mięśnie), naczyń krwionośnych i tkanek nerwowych [11].

Kończyna ma trzy osie symetrii, określone przez trzy centra sygnalizacyjne. Oś proksymalno-dystalna (PD lub bliższodalsza) przechodzi w kierunku od ramienia do czubków palców. Jest to kierunek głównego wzrostu ręki, regulowany przez białka wydzielane z AER. Oś anterioralno-posterioralna (AP lub przednio-tylna) przechodzi od kciuka (palec 1) do małego palca (palec 5). Ta oś jest regulowana przez centrum sygnalizacyjne umieszczone w posterialnej części pączka kończyny, tak zwanej Strefie Polaryzującej Aktywności – ZPA (*zone of polarizing activity*). Trzecia oś, dorsalno-wentralna (DV lub plecowo-brzuszną), określa grzbiet i wewnętrzną stronę dłoni. Jest



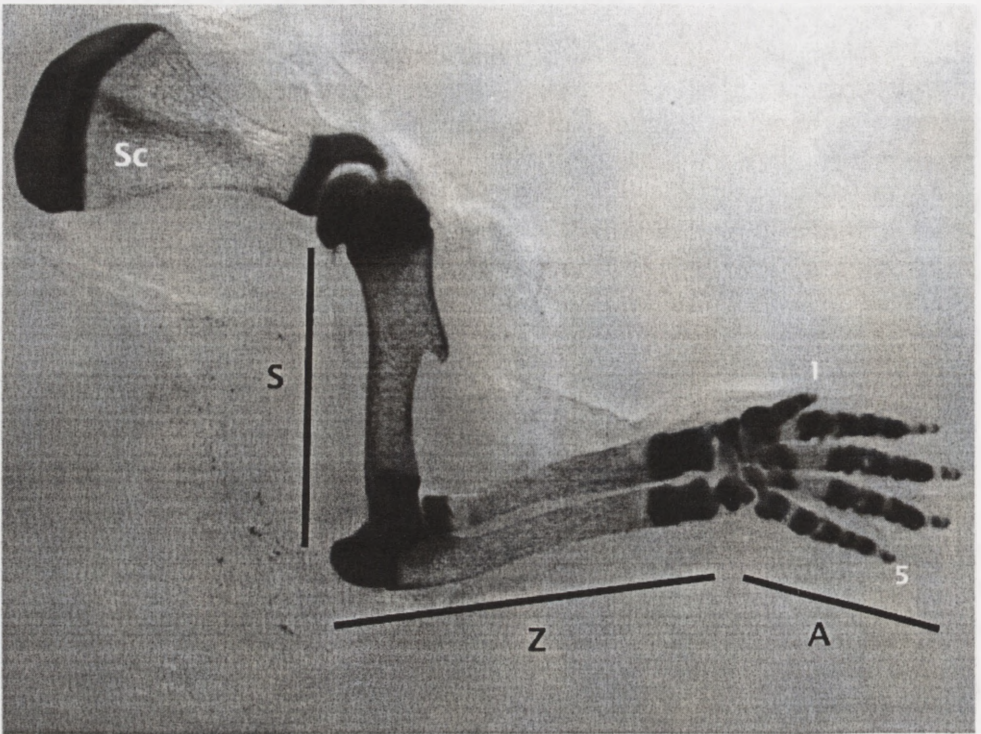
RYCINA 1. A) Zdjęcie rozwijającego się zarodka kury w stadium HH 23. E – oko, OV – rozwijające się ucho, FL – pąk skrzydła, HL – pąk nogi. Białym prostokątem jest zaznaczona kończyna tylna, powiększona w B). Schemat w B) pokazuje kierunki osi AP (górną - dół), PD (blisko - daleko) i DV (przód - tył). Czarna strzałka wskazuje obszar zajmowany przez ZPA. Struktura zaznaczona białymi strzałkami to AER

ona regulowana przez sygnały pochodzące z brzusznej ektodermy pokrywającej mezenchymę kończyny [41]. W tym artykule skoncentruję się na wynikach ostatnich badań, które poszerzają nasze zrozumienie, jak tworzą się osie PD i AP w trakcie rozwoju kończyny (ryc. 1B).

Jedną grupą czynników odpowiedzialną za układanie planu kończyny są produkty genów z rodziny *hox*. Funkcja tych genów została niedawno opisana i dlatego nie będzie poruszona w tym artykule [18]. Podstawy biologii rozwoju kończyny zostały też przedstawione w niedawno opublikowanym Zarysie Organogenezy [4].

PORÓWNANIE MODELI STREFY ROZWOJU I PREDETERMINACJI

Wczesne wyniki badań, których celem było zrozumienie mechanizmu wzrostu wzdłuż osi PD i różnicowania komórkowego w tym kierunku, wskazywały na regulacyjną funkcję AER w tych procesach. Jego usunięcie lub jakiegokolwiek inne uszkodzające



RYCINA 2. Preparat szkieletowy barwiony Alcian blue (czarne na zdjęciu) i Alizaryną Czerwoną (jasnoszare na zdjęciu) przedniej kończyny myszy w stadium 18.5 dpc. Czarny kolor zaznacza rozwijającą się chrząstkę, szary kolor barwi rozwijającą się kość. Sc – łopatka, S – stylopod, Z – zygopod, A – autopod. Numer 1 oznacza palec 1 – kciuk, numer 5 oznacza palec 5 – mały palec. Palec 1 określa anteryornalną stronę autopodu, a palec 5 – posterioralną

manipulacje zawsze wywołują deformacje kończyn wzdłuż głównej osi wzrostu [45, 42, 32, 35]. Co ważniejsze, fenotyp spowodowany tymi manipulacjami jest bezpośrednio uzależniony od stadium rozwoju, w którym taka manipulacja zostanie przeprowadzona. Usunięcie AER we wczesnych stadiach pozwala tylko na rozwój stylopodium, podczas gdy usunięcie AER w późniejszych stadiach pozwala na utworzenie zygo-, a nawet autopodium [28]. Poszukiwania białek odpowiedzialnych za aktywność AER wykazały, że Czynniki Wzrostu Fibroblastów (*Fibroblast Growth Factor*) Fgf4 lub Fgf8 są wystarczające i konieczne do regulacji wzrostu kończyn wzdłuż osi PD. Na przykład u rozwijających się zarodków kurczaków, wszczepienie perełek nasączonych Fgf4 lub Fgf8 w odległych częściach kończyn, zapobiega hamowaniu wzrostu i różnicowania komórek wywołanych brakiem AER [24, 43].

Rezultaty otrzymane w wyżej wymienionych pracach dostarczyły molekularnych podstaw do tak zwanego Modelu Strefy Postępu [35]. W tym modelu, długość czasu spędzonego przez komórki mezenchymalne znajdujące się tuż pod AER, w tak zwanej Strefie Postępu – PZ (*Progress Zone*), określałaby ich tożsamość. Innymi słowy, im dłużej te komórki pozostają w tej strefie, tym bardziej odległe struktury kończyny z

nich powstają. Ostatnio nowe badania, jak też reinterpretacja poprzednich wyników doprowadziły do stworzenia nowego modelu opisującego różnicowanie kończyn wzdłuż osi PD. Ten nowy model tak zwanej prespecyfikacji proponuje, że komórki mezenchymalne są zaprogramowane, aby uczestniczyć w tworzeniu stylo-, zygo- i autopodium już we wczesnym stadium tworzenia pąka kończynowego. W konsekwencji nie byłoby ważne, ile czasu spędzają one w Strefie Postępu. Zamiast tego komórki byłyby „naznaczone” do uczestniczenia w tworzeniu odpowiednich struktur kończyny niezależnie od czynnika czasowego.

Wykorzystując technikę inaktywacji genu kodującego *Fgf8* w myszach zostało pokazane, że jak przewidziano w modelu Strefy Postępu, białko *Fgf8* było niezbędne do wzrostu wzdłuż osi PD [17, 23]. Podobnie więc, jak u kurczaków, białko *Fgf8* było niezbędne do rozwoju kończyn, ale kilka kwestii zostało w dalszym ciągu nierozwiązanych. Jedną z nich był czasowy wymóg obecności *Fgf8*. Czy jest to białko potrzebne tylko do indukcji kończyny, czy też do jej utrzymania? Kolejna kwestia opierała się na fakcie, że inne białka z rodziny *Fgf* mogłyby być zaangażowane we wzrost wzdłuż osi PD. Tak więc, podczas gdy *Fgf8* byłoby konieczne, nie byłoby wystarczające do całkowitej regulacji tego procesu. Zamiast tego *Fgf8* mogłoby indukować inne białka z rodziny *Fgf*, które regulowałyby proces wzrostu wzdłuż osi PD.

Aby rozwiązać pierwszy problem, Gail Martin i współpracownicy udoskonaliли strategię regulowanej inaktywacji genów [36]. W tych doświadczeniach zastosowano powszechnie używaną technologię opartą na rekombinacji DNA za pośrednictwem *Cre* rekombinazy [30]. Używając tej strategii, można wygenerować myszy, u których gen przeznaczony do inaktywacji zostaje otoczony sekwencjami *LoxP*. Krzyżując te myszy z myszami, u których *Cre* rekombinaza jest pod kontrolą promotora aktywnego w określonych tkankach, spowoduje się rekombinację pomiędzy sekwencjami *LoxP* i usunięcie genu tylko w tkankach, gdzie *Cre* uległo ekspresji. *Cre* rekombinaza w doświadczeniach przeprowadzonych przez grupę Gail Martin była pod kontrolą promotora genu *msx2*, który ulega ekspresji tylko w AER.

Interesującą cechą ekspresji *msx2* jest jego dynamika. Rozwój kończyn przednich, włączając w to indukcję AER i ekspresję *Fgf8*, wyprzedza rozwój kończyn tylnych o około pół dnia [36]. Ponieważ kończyna przednia rozwija się wcześniej, *Fgf8* ulega ekspresji wcześniej w kończynie przedniej niż w tylnej. Z drugiej strony ekspresja genu *msx2* ma dokładnie odwrotną dynamikę, ulega ono ekspresji w kończynie tylnej, zanim zostanie aktywowane w kończynie przedniej, z różnicą kilku godzin. Zatem w doświadczeniach Gail Martin i współpracowników, *msx2* było aktywowane w kończynie przedniej po aktywacji *Fgf8*, podczas gdy w kończynie tylnej było ono aktywowane przed aktywacją *Fgf8*. W opisanych badaniach *Cre* rekombinaza w kończynach tylnych była zatem aktywowana, zanim *Fgf8* uległ ekspresji, powodując takie same dramatyczne zniekształcenia, jak podczas całkowitej inaktywacji tego genu. Otrzymany fenotyp w kończynie przedniej był jednak zaskakujący. Jej rozwój, jakkolwiek niecałkiem normalny, przebiegał bez dramatycznych zmian i pozwalał na tworzenie wszystkich elementów kostnych. Ponieważ dezaktywacja *Fgf8* w tej kończynie nastąpiła około jednej godziny po indukcji *Fgf8*, ten wynik sugerował, że krótki okres aktywacji *Fgf8* był wystarczający do utrzymania rozwoju całej kończyny. *Fgf8* byłby więc potrzebny do indukcji, ale nie do podtrzymania wzrostu kończyn.

Niemniej istniała możliwość, że względnie łagodny fenotyp spowodowany zakłóceniami w ekspresji *Fgf8* w kończynach mógł być spowodowany kompensacyjnym działaniem innych białek z rodziny *Fgf*. Dlatego też grupa Gail Martin stworzyła myszy, z których usunięto nie jeden, ale dwa geny, używając powyżej opisanej metody opartej na *msx2-Cre* regulowanej inaktywacji genów [36]. Poza *Fgf8*, autorzy zdezaktywowali *Fgf4*, znany cel sygnalizacji przez *Fgf8* w kończynach. Dezaktywacja tylko *Fgf4* nie powodowała deformacji kończyn [23]. Natomiast myszy po dezaktywacji obu genów *Fgf4* i *Fgf8* w ogóle nie miały tylnych kończyn. Wynik ten wskazuje, że *Fgf4/8* są konieczne i wystarczające do indukcji kończyny tylnej. Natomiast kończyny przednie u tych myszy mogły jednak powstać, chociaż ich fenotypy były różne, począwszy od raczej poważnych (tylko jeden dystalny segment był obecny) do raczej łagodnych (stylo-, zygo i autopod elementy były obecne) wskazując na to, że okres działania *Fgf4/8* przez około 60 minut był wystarczający, aby wzbudzić rozwój kompletnej kończyny. Podobne wyniki zostały otrzymane przez Capecchi i współpracowników [5].

Rezultaty tych badań kontrastowały z proponowanym wymogiem obecności *Fgf8* we wszystkich stadiach rozwoju kończyn, jak było to sugerowane przez model Strefy Postępu. Z powodu wątpliwości, czy może ten nieoczekiwany fenotyp był wynikiem kompensacji przez jeszcze inne *Fgf* obecne w rozwijającej się kończynie i wymieniącej/zastępującej *Fgf8*, zostały przeprowadzone dodatkowe doświadczenia oparte na analizie myszy, u których zdezaktywowano geny kodujące innych członków rodziny *Fgf*. Dokonano tego stosując powyżej opisaną strategię z wykorzystaniem rekombinazy *Cre* (przedstawione na Limb Conference w Dundee, July 2004). Te podwójne i potrójne nokauty genów z rodziny *Fgf* w rozwijających się kończynach myszy dostarczyły dodatkowych i interesujących informacji. Na przykład, jednoczesna dezaktywacja obu genów *Fgf8* i 9 spowodowała pośredni fenotyp pomiędzy *Fgf4/8* i *Fgf8*. Potrójna dezaktywacja *Fgf4*, 9 i 17 nie miała jakiegokolwiek wpływu na rozwój kończyny potwierdzając ważną funkcję, jaką pełnią *Fgf4/8* w tym procesie (Dundee Limb Conference 2004). W sumie, spośród 23 znanych *Fgf*, tylko *Fgf4* może zastąpić *Fgf8* w testach *in vitro*, a w czasie rozwoju kończyn transkrypcja tego genu jest zahamowana u myszy, które nie mają *Fgf8*, co tłumaczy relatywnie łagodny fenotyp spowodowany inaktywacją tylko genu *Fgf8*. Te wyniki pozwoliły stwierdzić, że ekspresja *Fgf8*, pomimo że jest wymagana do kontroli liczby komórek na początku formowania kończyny, nie jest potrzebna do jej utrzymywania, oraz że *Fgf4* mogło kompensować nieobecność *Fgf8* podczas wzrostu wzdłuż osi PD. Ta kompensacja jest jednak bardzo dokładnie określona w czasie, ponieważ około 90 min ekspresji było wystarczające, aby kończyny rozwinęły się prawie normalnie. Zatem, wbrew długo przeważającej hipotezie, sygnalizacja regulowana przez *Fgf* nie jest wymagana do utrzymywania osi PD.

Badania przeprowadzone w rozwijających się zarodkach kurzych dostarczyły dodatkowych wyników stawiających pod znakiem zapytania model Strefy Postępu. W tym przypadku badacze jeszcze raz przeanalizowali konsekwencje usunięcia AER z rozwijającej się kończyny [10]. Podczas tych eksperymentów, tak jak już wiele lat temu zauważono, że usunięcie AER powodowało apoptozę w komórkach mezodermy znajdującej się pod AER [15]. Problem apoptozy w tych warunkach nie był badany przez wiele lat, ale łatwo sobie wyobrazić, że usunięcie AER mogło spowodować

skrócenie kończyn, nie dlatego, że brakowało jakiegoś szczególnego sygnału, ale po prostu dlatego, że komórki, które miały wchodzić w skład kończyny, umierały w skutek mikromanipulacji. Dlatego też usunięcie AER w późniejszych stadiach rozwoju powodowało mniej drastyczne skrócenie kończyn, ponieważ już znaczna część kończyny została utworzona. Aby sprawdzić, czy FGF8 funkcjonowało w AER jako stymulator proliferacji komórkowej, eksperyment polegający na zastąpieniu AER czynnikiem wzrostu Fgf8 został powtórzony [10]. Autorzy pokazali, że rzeczywiście dodanie Fgf8 wzbudziło proliferację komórkową i mogło odwrócić efekt usunięcia AER. A co ważniejsze, ten efekt nie pojawiał się, jeśli okres pomiędzy usunięciem AER i dodaniem Fgf8 był zbyt długi. Było to prawdopodobnie spowodowane śmiercią zbyt wielu komórek zainicjowaną usunięciem AER, a tym samym brakiem Fgf8.

Następnie przeprowadzono eksperymenty znakowania komórek używając barwników fluorescencyjnych. W tych badaniach, barwniki zostały wstrzyknięte w rozwijające się kończyny kurzych embrionów i tak wyznakowane komórki były obserwowane w trakcie rozwoju kończyn. Precyzyjna lokalizacja zastrzyków pozwoliła na prześledzenie losu komórek w regionach tuż pod AER. Autorzy wstrzyknęli Dil, fluoryzujący barwnik, w różnej odległości od AER w stadium Hamburgera-Hamiltona (HH) 19 [12] i przeanalizowali lokalizację tego barwnika trzy dni później. Byli oni w stanie pokazać, że Dil oznaczał regiony stylo-, zygo- lub autopodu, co wskazuje na to, że komórki w mezenchymie kończyny były bardzo wcześnie zaprogramowane do udziału w formowaniu tych struktur. Wyniki eksperymentów polegających na przeszczepach regionów sub-AER na kikuty kończyn dawców dodatkowo umocniły hipotezę mówiącą, że komórki są zdeterminowane do formowania struktur kończyn bardzo wcześnie w rozwoju [10].

Czy zatem Model Strefy Postępu nadaje się do lamusa? Obecnie badacze w dziedzinie biologii rozwoju kończyn są podzieleni na dwa współzawodniczące ze sobą obozy i nie jest jeszcze całkiem rozstrzygnięte, który model lepiej tłumaczy wzrost kończyn w osi PD [21]. Podczas gdy nowy model tłumaczy stare i nowe rezultaty lepiej niż poprzednia hipoteza, nie jest jeszcze w stanie wytłumaczyć wszystkich uzyskanych wyników, tak więc na ostatnie słowo w tej kwestii trzeba będzie jeszcze poczekać.

TOŻSAMOŚĆ PALCA, CZYLI HISTORIA Shh

Tworzenie osi AP było przedmiotem intensywnych badań i także w tej kwestii ostatnie wyniki przyniosły kilka niespodzianek. Jednym z doświadczalnych systemów najczęściej używanych do studiowania tworzenia się tej osi jest proces formowania się palców i określenia ich tożsamości. Doświadczenia te są przeprowadzane u myszy lub kur, jednak rozwijający się kurczak jest ciągle najbardziej popularnym modelem badawczym. Jedną z zalet tego systemu jest to, że palce u kurczaka mają zmienną liczbę stawów zależnie od miejsca, jakie ten palec zajmuje wzdłuż osi AP. Podczas gdy u myszy wszystkie palce, poza kciukiem (palec 1), mają tę samą liczbę stawów, u kurczaka każdy palec ma wzrastającą liczbę stawów w kierunku AP. Tak więc najbardziej anterioralny palec (kciuk) ma dwa stawy, kolejny 3 itd., co pozwala na łatwe określenie tożsamości palców i tworzy system bardzo przydatny do badania czynników interferujących z tworzeniem się osi AP.

Podczas rozwoju embrionalnego, mezenchyma znajdująca się w przyszłym autopodzie kondensuje się tworząc tak zwane promienie palcowe, które następnie ulegają różnicowaniu. Region odpowiedzialny za to różnicowanie jest nazywany Strefą Aktywności Polaryzującej – ZPA (*zone of polarizing activity*) i jest ulokowany w najbardziej posterioralnej (tylnej) części pąka kończyny (ryc. 1B, strzałka). Ten region został zidentyfikowany w latach sześćdziesiątych XX wieku przez J. Saundersa i współpracowników, którzy przeprowadzili różnego rodzaju transplantacje tkanek kończyny [31]. Na przykład, gdy tylna część tego pąka została przeszczepiona na przednią część innego pąka, powstający autopod rozwinął się z lustrzaną duplikacją palców. Tak więc zamiast porządku 2, 3, 4 palców w skrzydle w kierunku AP, powstał autopod z palcami 4, 3, 2, 2, 3, 4. Poszukiwania molekularnych podstaw tego procesu wykazały, że głównym białkiem odpowiedzialnym za polaryzację w kierunku AP był *Sonic Hedgehog* (Shh) [14, 27]. Wszczepienie perełki nasyczonej Shh w przednią część pąka kończyny, tak jak i transplantacja ZPA, powodowały bowiem lustrzaną duplikację palców. Ponieważ nowoutworzone palce utrzymywały poprawną tożsamość zdefiniowaną za pomocą liczby stawów, badania te sugerowały, że Shh nie tylko byłby odpowiedzialny za tworzenie osi AP i indukcję palców, ale też określałby ich tożsamość w zależności od stężenia, zachowując się tym samym jak morfogen.

Nowe wyniki sugerują jednak, że funkcja Shh w określaniu osi AP nie jest tak prosta, jak było to początkowo postulowane. Na przykład, można by oczekiwać, że dezaktywacja Shh spowoduje nieobecność wszystkich palców, a nawet utratę całej kończyny. Niespodziewanie, dezaktywacja Shh pozwoliła na powstanie stylo- i zygotodu, a nawet na częściowe utworzenie autopodu z jednym palcem w kończynach tylnych myszy i pozostałości palca w kończynach przednich [7, 34, 8]. Ten wynik zakwestionował dotychczas proponowaną rolę Shh jako kluczowego białka regulującego różnicowanie się kończyn i powstawanie palców. Nawet więcej, dostarczył dowodów, że Shh nie jest wcale wymagany do tworzenia stylo- lub zygotodu, ani do tworzenia przynajmniej jednego palca. Te wyniki stały się jeszcze bardziej interesujące, gdy przeanalizowano myszy, u których zdeaktywowano geny kodujące białka zaangażowane w przekazywanie sygnału przez Shh.

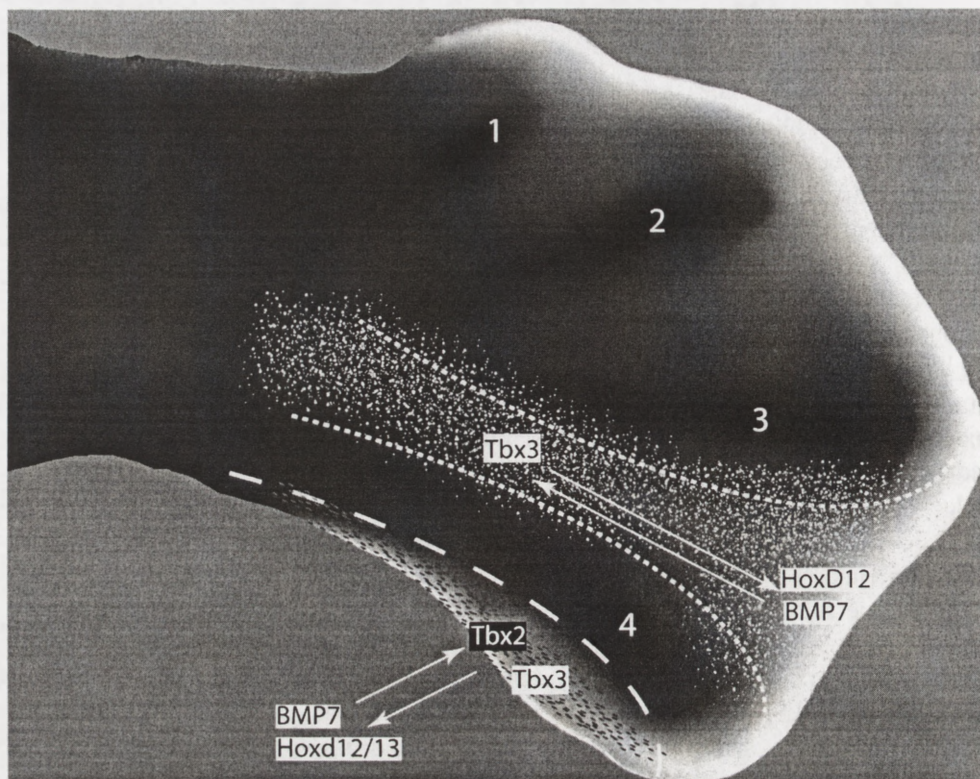
Shh bierze udział w przekazywaniu sygnałów w komórce poprzez wiązanie się do kompleksu receptorów *Patched-Smoothed* (Ptc-Smo) znajdujących się na błonie komórkowej. Wiązanie się Shh do tego kompleksu, a w szczególności do Ptc, powoduje, że represja Smo przez Ptc zostaje usunięta pozwalając Smo na aktywację członków rodziny czynników transkrypcyjnych Gli w komórce. Znane są trzy białka z tej rodziny: Gli1, 2 i 3. Wszystkie trzy ulegają ekspresji w rozwijających się kończynach, głównie w niepokrywających się obszarach [6, 22]. Zostało zaproponowane, że Gli3 jest najważniejszym czynnikiem z tej rodziny przekazującym sygnał pochodzący od białka Shh w rozwijających się kończynach. Ta hipoteza została oparta na wynikach analizy myszy, u których geny Gli1, 2 lub 3 zostały zdezaktywowane. Tylko dezaktywacja Gli3 powodowała zmiany fenotypu kończyn [22, 25]. Zaskakująco, dezaktywacja Gli3 odkryta w spontanicznym mysim mutancie *extratoes* spowodowała przedosiową polidaktylię, sugerując, że szlaki przekazywania sygnału przez Shh zależne od Gli3

ograniczyłyby raczej niż indukowały ilość palców [16]. Ponadto, podwójna dezaktywacja genów *Shh/Gli3* „ratowała” do pewnego stopnia fenotyp dezaktywacji genu *Shh*, przywracając wielopalczastość i tym samym wskazując, że ani *Gli3*, ani *Shh* nie są potrzebne do indukcji lub regulacji liczby palców [19].

Jak można by tłumaczyć te wyniki? *Gli3* jest bipotencjalnym czynnikiem transkrypcyjnym, który może działać jako represor lub aktywator transkrypcji. Jeśli białko *Gli3* jest poddane specyficjnej wewnątrzkomórkowej proteolizie, działa ono jako represor (*Gli3R*). *Shh*, poprzez *Smo*, blokuje proces proteolizy przekształcając *Gli3* w formę aktywatora (*Gli3A*) [29]. Tak więc w normalnej sytuacji *Gli3R* jest obecne w całym autopodzie, a *Shh*, produkowany w ZPA, formuje gradient wzdłuż osi AP. *Gli3R* znajdujący się blisko ZPA jest pod wpływem *Shh*, który regulując przekształcenie *Gli3R* w *Gli3A*, pozwala tym samym na formowanie określonej liczby palców (pięciu u myszy). Pod nieobecność genu kodującego *Gli3* (mysi mutant *extratoes*), *Gli3A* nie może powstać, a jednocześnie pojawiają się dodatkowe palce. Ten wynik sugeruje, że *Gli3A* reguluje ilość palców w negatywny sposób, poprzez ograniczanie ich ilości do pięciu. Z kolei podczas nieobecności *Shh*, tylko *Gli3R* jest obecne w komórkach, pozwalając na tworzenie tylko palca 1 (kciuka) [19]. Przedstawione wyniki wskazują na dwie istotne rzeczy.

Jedną z nich jest to, że represorowa forma *Gli3* (*Gli3R*) skutecznie blokuje tworzenie się palców 2–5. Drugą jest możliwość, że szlaki regulowane przez *Shh* nie są zaangażowane w tworzenie się przynajmniej pierwszego palca, kciuka. Pod nieobecności obu genów wielopalczastość zostaje znów przywrócona wskazując na to, że jeszcze inny, dotychczas nieznan mechanizm reguluje tworzenie się palców. Interesującym aspektem tego wyniku jest możliwość, że być może istnieje ewolucyjna determinacja do utrzymania stałej ilości palców u kręgowców.

Jeśli *Shh* nie jest wymagany do indukcji palców, czy jest wymagany do określania ich tożsamości? Niedawno przetestowano tę hipotezę korzystając z modelu rozwijającego się zarodka kurczaka i faktu, że jak już wspomniałem, tożsamość palców w tym modelu jest, między innymi, określana poprzez ilość stawów w palcach. Przeprowadzając mikromanipulacje, Dahn i Fallon pokazali, że usunięcie międzypalcowej mezenchymy pomiędzy palców 2 i 3 przekształciło palec 2 w palec 1 [9]. Następnie, separując dwa rozwijające się palce folią aluminiową autorzy pokazali, że czynnik odpowiedzialny za to przekształcenie dyfundował do przestrzeni pozakomórkowej. W końcu, poprzez pokazanie, że tożsamość palców była wrażliwa na zbyt dużą ilość białek *Bmp* lub *Noggin* (antagonista *Bmp*), udowodnili, że *Bmp*, a nie *Shh*, było bezpośrednio odpowiedzialne za określanie tożsamości palców [19]. Kolejne prace, wykonane przez Ogura i współpracowników pokazały, że *Bmp* regulowało tożsamość palców poprzez indukcję czynników transkrypcyjnych *Tbx2* i *Tbx3* [37]. Dodatkowo wykazano, że *Shh* było wymagane do posterioralnej indukcji palców, ale nie było wymagane do określania ich tożsamości. Zamiast tego, pętla regulacyjna złożona z *Bmp/Hoxd12/13* i *Tbx2/3* była wymagana do określania najbardziej posterioralnego palca (czwarty u kurczaka). Palec 3 natomiast był określany przez ścieżki sygnałowe zależne od *Bmp7*, *Hoxd12* i *Tbx2*, a najbardziej anterioralny palec był niezależny od tych szlaków (ryc. 3). Te wyniki dodatkowo poparły tezę, że proces tworzenia osi AP w kończynie jest o wiele bardziej skomplikowany niż początkowo zakładano i że jest on tylko częściowo pod wpływem sygnalizacji zależnej od *Shh*.



RYCINA 3 (zmodyfikowana z [37]). Rozwijająca się kończyna tylna zarodka kury w stadium HH 31. Palce są ponumerowane 1–4 w kierunku A/P. Linia przerywana określa granicę pomiędzy IV palcem i mezenchymą (obszar oznaczony szarymi cętkami). Linie kropkowane wydzielają obszar mezenchymy międzypalcowej (obszar oznaczony białymi kropkami) pomiędzy palcami 3 i 4. Strzałki reprezentują pozytywne interakcje

Inny interesujący zwrot w zrozumieniu funkcji Shh w określaniu tożsamości palców pojawił się w związku z analizą myszy, u których ekspresja rekombinazy Cre była pod kontrolą elementów regulatorowych pochodzących z promotora genu Shh, wiernie odtwarzających dynamikę ekspresji Shh podczas rozwoju kończyn (Shh-Cre). Otóż zaproponowano, że Shh mógłby działać jako prawdziwy morfogen, działając na odległość i wywołując różne efekty biologiczne w zależności od stężenia. Na przykład, gdy Shh ulegał ekspresji w ZPA, mógłby on regulować tożsamość palców w zależności od odległości od ZPA, poprzez precyzyjną modulację stosunku Gli3R do Gli3A. Aby zbadać tę możliwość, autorzy prześledzili los komórek, u których Shh uległ ekspresji w kończynie. Zostało to osiągnięte przez skrzyżowanie Shh-Cre transgenicznych myszy z innymi transgenicznymi myszami, ROSA26-βgal. U tych myszy gen reporterowy kodujący β-galaktozydazę jest aktywowany tylko w obecności rekombinazy Cre. Tak więc w potomstwie pochodzącym z takiej krzyżówki, Cre rekombinaza powodowała permanentną aktywację β-galaktozydazy w komórkach, w których Shh kiedykolwiek uległ ekspresji ujawniając czasowo-przestrzenną regulację tego genu. Analiza tych myszy

pokazała, że komórki, w których Shh uległ ekspresji, znajdowano początkowo w ZPA, później wykryto w mezenchymie palców 5, 4 i 3 [2].

Białko Shh może zostać wydzielone do przestrzeni międzykomórkowej po potranslacyjnej modyfikacji, polegającej na dodaniu do niego cząsteczki cholesterolu. Dezaktywacja genu odpowiedzialnego za ten proces, *dispatched 1 (displ)*, powoduje zahamowanie dyfuzji Shh i pozwala na rozdzielenie autokrynych i parakrynych efektów działania Shh. Ten fakt, razem z opartą na systemie Cre-lox dezaktywacją genów, pozwolił badaczom na zbadanie krótko i długodystansowych efektów, jakie Shh wywiera na formowanie palców u myszy. Cre rekombinaza, ulegająca ekspresji pod kontrolą elementów promotora *shh*, została użyta do usunięcia genu kodującego *displ* z rozwijającego się pąka kończyny [13]. Powstałe w ten sposób potomstwo miało normalne palce 5, 4 i 3, palca 2 nie było, a palec 1 był normalny. Ten wynik pozwolił na wyciągnięcie wniosku, że Shh oddziałuje autokrynnie w trakcie tworzenia palców 5, 4 i 3 oraz parakrynnie w czasie tworzenia palca 2. Ta praca dodatkowo potwierdziła, że Shh nie jest potrzebny do tworzenia palca 1.

W dwóch kolejnych pracach przedstawiono wyniki badań, w których wykazano, że czynnik transkrypcyjny dHand działa powyżej białek Shh/Gli na szlaku przekazywania sygnału [39, 38].

Model różnicowania wzdłuż osi AP oparty na sygnalizacji regulowanej przez Shh, zaproponowany jakieś 30 lat temu, został więc ostatnio poddany przeglądowi i rewizji dzięki wyżej wspomnianym badaniom. Rzeczywiście, podczas gdy ekspresja Shh jest krytyczna dla prawidłowego rozwoju kończyn, mogłaby ona ograniczać raczej niż indukować liczbę palców, nie być krytyczna dla określania ich tożsamości i wcale nie być związana z tworzeniem stylo- lub zygotodu.

PERSPEKTYWY

W jakim punkcie zatem znajduje się obecnie biologia rozwoju kończyn? Sekwencje genomów wielu organizmów zostały już poznane, różne rodzaje „omics” (*transcriptomics*, *proteomics* itd.) są stosowane do analizy molekularnego stanu tkanek, jak również ciągle pojawiają się nowe sposoby na modyfikowanie genów. Wszystko to razem pozwala nam na nowe podejście do klasycznych eksperymentów embriologicznych. To nowe spojrzenie ujawniło, że nawet dobrze opisane i zbadane modele doświadczalne ciągle dostarczają nam niespodzianek, które zmuszają nas do przepisania niektórych rozdziałów w podręcznikach. Kombinacja bogactwa informacji otrzymanej z biologii rozwoju embrionalnego i dostępność molekularnych narzędzi zwiastuje bardzo interesującą przyszłość w biologii rozwoju generalnie, a w biologii kończyn w szczególności.

Ciągle jeszcze dużo pytań dotyczących rozwoju kończyn pozostaje bez odpowiedzi, czasami od dość dawna. Uwaga badaczy skupia się obecnie bardziej na osiach AP i PD niż DV. Ta ostatnia oś jest regulowana poprzez interakcję pomiędzy dwoma białkami. Jednym z nich jest sekrecyjne białko regulujące dorsalną część kończyny, Wnt7a. Drugim

z nich jest czynnik transkrypcyjny *Engrailed*, regulujący wentralny aspekt kończyny poprzez regulowanie ekspresji jego białka docelowego, *Lmx1* [26]. Bardzo mało wiadomo o białkach docelowych *Wnt7a* albo *Engrailed* w tych procesach. Wczesne doniesienia wskazywały, że *Engrailed* (transkrypcyjny represor *Wnt7a*) obecny w wentralnej ektodermie, byłby zaangażowany w indukcję *Shh* w ZPA, ale jego dezaktywacja spowodowała defekty w osiach DV i PD, ale nie w osi AP prawdopodobnie poprzez indukcję defektów w AER [1].

Podczas gdy więcej wiadomo o rozwoju osi AP, ciągle nie wiadomo, jak jest określana ilość palców (4 w nodze i 3 w skrzydle u kurczaka, 5 u myszy), ani co jest bezpośrednio odpowiedzialne za indukcję stawów. Dodatkowo, ostatnie doniesienia, inaczej niż dotychczas zakładano, opisały rolę, jaką *Wnt* mógłby odgrywać w określaniu osi AP. W tych badaniach przeanalizowano pętlę regulatorową składającą się z białek *Wnt*, *Dkk1* (antagonista *Wnt*) i *Lrp6* (putatywny receptor *Wnt*) [20]. Proponowany nowy system, niezależnie od *Shh*, regulowałby ilość palców poprzez pętlę *Wnt/Dkk1/Lrp6* i działałby poprzez doprecyzowywanie przekazywania sygnałów przez *Wnt*. Potrzeba jednak więcej badań, aby te obserwacje potwierdzić.

Formowanie osi PD, być może najintensywniej badane, nie jest jeszcze w pełni poznane, ponieważ niektóre z opisanych wyników nie mogą być wytłumaczone ani przez modele Strefy Postępu, ani Prespecyfikacji. Dlatego też nowe eksperymenty powinny zostać przeprowadzone, co obiecuje ekscytujący okres w dziedzinie biologii rozwoju kończyn.

Szczegółowa wiedza dotycząca molekularnych podstaw kierujących procesami rozwoju kończyn jest niezbędna, aby lepiej zrozumieć procesy chorobowe występujące w okresie postnatalnym. Staje się coraz bardziej oczywiste, biorąc pod uwagę raczej ograniczoną liczbę szlaków sygnalizacyjnych, że niektóre z nich są prawdopodobnie reaktywowane w nieodpowiednim czasie lub miejscu, prowadząc do różnego rodzaju patologii, na przykład artretyzmu. Dokładna molekularna i genetyczna analiza dróg przekazywania sygnałów w komórce, które są aktywne w trakcie normalnego rozwoju kończyn, jest zatem bardzo ważną do zrozumienia procesów chorobowych i odpowiedniego zaprojektowania indywidualnych, molekularnych strategii do leczenia symptomów lub nawet całkowitego wyleczenia schorzenia. Ta taktyka, razem z pojawiającą się technologią opartą na komórkach macierzystych oraz z uzupełniającym podejściem opartym na inżynierii tkankowej, tworzy podstawy długoterminowych rozwiązań w leczeniu chorób.

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym podziękować Frankowi Luyten, Kristin Verschueren oraz członkom mojego laboratorium za krytyczne przeczytanie angielskojęzycznej wersji tego manuskryptu, a także Joannie Dzwonek za ogromną pomoc w przetłumaczeniu oryginału na język polski. Wszystkie błędy w tym artykule są jednak moje.

Ryciny prezentowane w tym artykule zostały zaczerpnięte z pracy własnej, finansowanej w ramach grantu Narodowej Fundacji Nauki w Belgii, FWO G.0168.03.

LITERATURA

- [1] ADAMSKA M, MACDONALD BT, SARMAST ZH, OLIVER ER, MEISLER MH. En1 and Wnt7a interact with Dkk1 during limb development in the mouse. *Dev Biol* 2004; 1: 134–144.
- [2] AHN S, JOYNER AL. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 2004; 4: 505–516.
- [3] ARISTOTLE. Generation of animals. wznowienie 1943; , A. L. Peck, ed. (Cambridge, Mass: Harvard University Press).
- [4] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Zarys Organogenezy. PWN, Warszawa 2004.
- [5] BOULET AM, MOON AM, ARENKIEL BR, CAPECCHI MR. The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* 2004;15: 361–372.
- [6] BUSCHER D, RUTHER U. Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Dev Dyn* 1998; 1: 88–96.
- [7] CHIANG C, LITINGTUNG Y, HARRIS MP, SIMANDL BK, LI Y, BEACHY PA, FALLON JF. Manifestation of the limb prepatter: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 2001; 2: 421–435.
- [8] CHIANG C, LITINGTUNG Y, LEE E, YOUNG KE, CORDEN JL, WESTPHAL H, BEACHY PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; 6599: 407–413.
- [9] DAHN RD, FALLON JF. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 2000; 5478: 438–441.
- [10] DUDLEY AT, ROS MA, TABIN CJ. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 2002; 6897: 539–544.
- [11] GILBERT SF. Developmental biology. Sinauer Associates Inc. 2003.
- [12] HAMBURGER V, HAMILTON HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 1992; 4: 231–272.
- [13] HARFE BD, SCHERZ PJ, NISSIM S, TIAN H, MCMAHON AP, TABIN CJ. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 2004; 4: 517–528.
- [14] HELMS J, THALLER C, EICHELE G. Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud. *Development* 1994; 11: 3267–3274.
- [15] JANNERS MY, SEARLS RL. Effect of removal of the apical ectodermal ridge on the rate of cell division in the subridge mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol* 1971; 4: 465–476.
- [16] JOHNSON DR. Extra-toes: a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1967; 3: 543–581.
- [17] LEWANDOSKI M, SUN X, MARTIN GR. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 2000; 4: 460–463.
- [18] LI X, CAO X. BMP signaling and HOX transcription factors in limb development. *Front Biosci* 2003; s805–s812.
- [19] LITINGTUNG Y, DAHN RD, LI Y, FALLON JF, CHIANG C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 2002; 6901: 979–983.
- [20] MACDONALD BT, ADAMSKA M, MEISLER MH. Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* 2004; 11: 2543–2552.
- [21] MARIANI FV, MARTIN GR. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* 2003; 6937: 319–325.
- [22] MO R, FREER AM, ZINYK DL, CRACKOWER MA, MICHAUD J, HENG HH, CHIK KW, SHI XM, TSUI LC, CHENG SH, JOYNER AL, HUI C. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 1997; 1: 113–123.
- [23] MOON AM, CAPECCHI MR. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 2000; 4: 455–459.
- [24] NISWANDER L, TICKLE C, VOGEL A, BOOTH I, MARTIN GR. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 1993; 3: 579–587.
- [25] PARK HL, BAI C, PLATT KA, MATISE MP, BEEGLY A, HUI CC, NAKASHIMA M, JOYNER AL. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000; 8: 1593–1605.
- [26] RIDDLE RD, ENSINI M, NELSON C, TSUCHIDA T, JESSELL TM, TABIN C. Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 1995; 4: 631–640.

- [27] RIDDLE RD, JOHNSON RL, LAUFER E, TABIN C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993; 7: 1401–1416.
- [28] ROWE DA, FALLON JF. The effect of removing posterior apical ectodermal ridge of the chick wing and leg on pattern formation. *J Embryol Exp Morphol* 1981; 65 Suppl. 309–325.
- [29] SASAKI H, NISHIZAKI Y, HUI C, NAKAFUKU M, KONDOH H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 1999; 17: 3915–3924.
- [30] SAUER B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 1998; 4: 381–392.
- [31] SAUNDERS JW jr., GASSELING MT. Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. 1968; 78–97. In: *Epithelial-Mesenchymal Interactions* (Eds. Fleischmajer, R. and Billingham, R.F.). Williams and Wilkins, Baltimore.
- [32] SMITH JC, TICKLE C, WOLPERT L. Attenuation of positional signalling in the chick limb by high doses of gamma-radiation. *Nature* 1978; 5654: 612–613.
- [33] SPEMANN H, MANGOLD H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species (Reprinted from *Archiv Mikroskopische Anatomie Entwicklungsmechanik*, vol 100, pg 599–638, 1924). *Inter J Develop Biol* 2001; 1: 13–38.
- [34] ST JACQUES B, DASSULE HR, KARAVANOVA I, BOTCHKAREV VA LI J, DANIELIAN PS, MCMAHON JA, LEWIS PM, PAUS R, MCMAHON AP. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol* 1998; 19: 1058–1068.
- [35] SUMMERBELL D, LEWIS JH, WOLPERT L. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 1973; 5417: 492–496.
- [36] SUN X, MARIANI FV, MARTIN GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 2002; 6897: 501–508.
- [37] SUZUKI T, TAKEUCHI J, KOSHIBA-TAKEUCHI K, OGURA T. Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Dev Cell* 2004; 1: 43–53.
- [38] TE WELSCHER P, FERNANDEZ-TERAN M, ROS MA, ZELLER R. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev* 2002; 4: 421–426.
- [39] TE WELSCHER P, ZUNIGA A, KUIJPER S, DRENTH T, GOEDEMAN HJ, MEIJLINK F, ZELLER R. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* 2002; 5594: 827–830.
- [40] TICKLE C. Limb development: an international model for vertebrate pattern formation. *Int J Dev Biol* 2000; 1: 101–108.
- [41] TICKLE C. Molecular basis of vertebrate limb patterning. *Am J Med Genet* 2002; 3: 250–255.
- [42] TICKLE C, SUMMERBELL D, WOLPERT L. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 1975; 5497: 199–202.
- [43] VOGEL A, RODRIGUEZ C, IZPISUA-BELMONTE JC. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* 1996; 6: 1737–1750.
- [44] WOLPERT L. Principles of development. Oxford University Press. 2002.
- [45] WOLPERT L, LEWIS J, SUMMERBELL D. Morphogenesis of the vertebrate limb. *Ciba Found. Symp.* 1975; 29: 95–130.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 31.08. 2005 r.

Przyjęto: 07.09. 2005 r.

Box 813, University of Leuven

Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

email: przemko@med.kuleuven.be

WYBRANE ASPEKTY POWSTAWANIA ORGANICZNEJ MACIERZY MINERALIZOWANYCH TKANEK ZĘBA ORAZ ZMIANY JEJ FIZJOLOGII SPOWODOWANE WPLYWEM ENDOGENNEJ PROFILAKTYKI FLUORKOWEJ. CZĘŚĆ I. SZKLIWO

THE ASPECTS OF THE FORMATION OF EXTRACELLULAR MATRIX
IN MINERALIZED TISSUES INCLUDING THE DISTURBANCES CAUSED
BY FLUORIDE. PART I. ENAMEL

Izabela MACIEJEWSKA, Zdzisław BEREZNOWSKI

Zakład Implantoprotetyki Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie: Rozwój szkliwa rozpoczyna się od sekrecji organicznej macierzy, na którą składają się białka głównie z grupy amelogenin i enamelin. W trakcie dojrzewania szkliwa organiczna macierz podlega procesom proteolitycznej degradacji, a produkty jej rozpadu są sukcesywnie usuwane i zastępowane kryształami hydroksyapatytów tworzącymi pryzmaty szkliwne. Proces sekrecji oraz mineralizacji szkliwa może ulec modyfikacjom na skutek wprowadzenia jonów fluorkowych w postaci endogennej profilaktyki fluorkowej. Bardzo trudno jest określić optymalną dawkę dobową fluoru, której przekroczenie skutkuje zaburzeniami mineralizacji oraz powstawaniem fluorozy zębów. Mechanizm powstawania fluorozy jak dotąd nie został w pełni wyjaśniony, jakkolwiek istnieje coraz więcej potwierdzonych dowodów, iż jest ona efektem zaburzeń w proteolitycznej degradacji białek tworzących organiczną macierz szkliwa. W pracy omówiono najbardziej istotne białka biorące udział w procesie powstawania organicznej macierzy szkliwa oraz wpływ fluoru na metabolizm omawianych białek ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w powstawaniu zaburzeń mineralizacji szkliwa.

Słowa kluczowe: macierz organiczna, szkliwo, fluorek.

Summary: Dental enamel is the most mineralized tissue all over the body. The enamel development begins with the organic matrix secretion. The enamel extracellular matrix mainly consists of amelogenins and enamelins. As the enamel maturation progress the organic matrix undergoes proteolytic degradation. The remnants, which remain after the degradation are subsequently withdrawn and replaced with hydroxyapatites crystals which form the enamel prisms. The enamel secretion and maturation can be modified by fluoride ions supplemented per os. It is extremely difficult to establish the daily optimal dose of fluoride which if exceeded leads to disturbances in the enamel mineralization and the fluorosis origin. The mechanism of the dental fluorosis origin has not been completely explained yet. Nevertheless the available data confirm that dental fluorosis is a side effect of disturbances in the proteolytic degradation of

the proteins that form the enamel extracellular matrix. In the paper we depicted the proteins which are the main components of the enamel extracellular matrix as well as the influence that fluoride exerts on their metabolism, which can result in the fluorosis.

Keywords: extracellular matrix, fluoride, enamel.

WSTĘP

Narząd szkliwotwórczy zęba rozwija się z pochodzącej z ektodermi listewki zębowej. Jego rozwój rozpoczyna się w bardzo wczesnym okresie życia płodowego i przechodzi kolejne fazy morfologiczno-histologicznego różnicowania komórek aż do wykształcenia w pełni dojrzałych ameloblastów odpowiedzialnych za tworzenie szkliwa. W pierwszym okresie rozwoju szkliwa – fazie sekrecyjnej następuje odkładanie organicznej macierzy, która w kolejnych fazach (przejściowej i dojrzewania) ulega mineralizacji.

POWSTAWANIE MATRYCY BIAŁKOWEJ W SZKLIWIE (APOZYCYJNE ODKŁADANIE SZKLIWA)

Dojrzałe szkliwo zęba jest najbardziej zmineralizowaną, bezkomórkową tkanką organizmu. Stopień mineralizacji wynosi 92–96%, pozostałe składniki to woda i substancje organiczne. Zbudowane jest z kryształów hydroksyapatytów – $\text{HP Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ tworzących zorganizowane struktury pryzmatów szkliwnych [55]. Rozwój szkliwa przebiega w trzech fazach: sekrecyjnej, przejściowej oraz dojrzewania [49]. Powstawanie szkliwa rozpoczyna się od wydzielania przez wypustkę ameloblastów, zwaną wyrostkiem Tomesa, białek (niektóre występują jedynie w szkliwie) tworzących swoiste rusztowanie dla wzrastających kryształów hydroksyapatytów [37,62,68]. Białkiem prawdopodobnie odpowiedzialnym za inicjację powstawania kryształów hydroksyapatytów jest tuftelina (55 kDa), jedyne białko pojawiające się we wczesnej fazie sekrecyjnej na granicy szkliwno-zębinowej. Nie wiadomo, czy pełni ona funkcję cząsteczki sygnalizacyjnej, czy też bierze bezpośredni udział w inicjacji tworzenia kryształów hydroksyapatytów szkliwa [23,24]. Istnieje hipoteza, iż za krystalizację kryształów HA w szkliwie odpowiedzialne są białka charakterystyczne dla zębiny, fosfoproteiny i sialoproteiny zębiny [8]. Mineralizacja szkliwa następuje natychmiast po tym, jak ameloblasty rozpoczną wydzielanie organicznej macierzy, jednak stopień mineralizacji we wczesnej fazie sekrecyjnej wynosi jedynie 30% [49]. Dokładnie nie wiadomo, w jaki sposób dochodzi do wzrostu pryzmatów szkliwnych w długiej osi (oś – c) poza faktem, iż jest to wzrost preferowany energetycznie [56]. Nie stwierdzono, czy wzrost pryzmatów odbywa się poprzez dokładanie kolejnych jonów do pierwotnego miejsca krystalizacji, czy powstają niezależne, liniowo zorientowane, sferyczne miejsca krystalizacji, które w późniejszym etapie rozwoju ulegają fuzji [50].

Jednocześnie z inicjacją powstania pierwszych centrów krystalizacji ameloblasty rozpoczynają wydzielanie białek amelogenin i enamelin, stanowiących organiczne rusztowanie dla tworzących się zmineralizowanych struktur szkliwa – pryzmatów

szkliwnych [15,61]. Stwierdzono, że obydwie grupy białek mają silne powinowactwo do wiązania składników mineralnych, wapnia, fosforanów i węglanów. Bogate w prolinę, histydynę i glutaminian amelogeniny w fazie sekrecyjnej stanowią 90% organicznej macierzy szkliwa i umiejscawiają się w rdzeniu tworzących się pryzmatów. Macierzyste amelogeniny o masie cząsteczkowej 25 kDa zlokalizowane są głównie w powierzchniowej warstwie nowo utworzonego szkliwa, szybko jednak podlegają degradacji, prawdopodobnie poprzez odłączenie C-końcowego telopeptydu, co nadaje im silne właściwości hydrofobowe, podnosi zdolność agregacji oraz redukuje masę cząsteczkową do 20 kDa [54]. Tak zredukowane cząsteczki tworzą główną strukturę organicznej macierzy szkliwa modulującą wzrost kryształów hydroksyapatytów. Kolejne, chronologiczne procesy proteolitycznej degradacji prowadzą do ich rozkładu na rozpuszczalne fragmenty o masie cząsteczkowej 11–13 kDa oraz silnie nierozpuszczalne, bogate w tyrozynę reszty 5 kDa (TRAP) [16, 28, 29]. Pod koniec fazy sekrecyjnej prawie wszystkie amelogeniny powinny ulec proteolitycznej degradacji i zostać usunięte z tworzącej się tkanki szkliwnej. Jedynie silnie agregujące cząstki TRAP pozostają w szczątkowej ilości w zewnętrznej warstwie pryzmatów szkliwnych. W trakcie fazy sekrecyjnej amelogenezy, amelogeniny (20 kDa) warunkują orientację przestrzenną i prawidłowy wzrost pryzmatów szkliwnych na długość, stanowiąc swoiste wsporniki dla nowo powstających pryzmatów szkliwnych, zapewniając im jednocześnie homogenny kształt [29]. Jednak całkowita degradacja amelogenin oraz usunięcie produktów ich rozkładu pod koniec fazy sekrecyjnej jest bezwzględny warunkiem dalszego wzrostu pryzmatów w pozostałych wymiarach, czyli na grubość i szerokość (osie a,b) [53]. W rdzeniu pryzmatów, w bezpośrednim sąsiedztwie amelogenin występuje grupa białek o silnie kwaśnym charakterze zwana enamelinami [31,64]. Enameliny, czyli wszystkie białka niebędące amelogeninami, w swym składzie zawierają duże ilości kwasu glutaminowego, asparaginowego, seryny oraz glicyny. Podobnie jak amelogeniny macierzyste cząsteczki enamelin o m.cz. 150 kDa, ulegają degradacji (89 kDa > 65 kDa > 32 kDa) w trakcie fazy sekrecyjnej, a także podlegają postranslacyjnym modyfikacjom, tj. fosforylacji i glikozylacji [32, 70]. Przeciwnie do amelogenin nie są one całkowicie usuwane w trakcie dojrzewania szkliwa i dlatego można je również wykryć w szkliwie dojrzałym jako cząstki o masie cząsteczkowej 32 kDa, silnie związane z pryzmatami szkliwa [59]. Fakt sekrecji enamelin w bardzo wczesnej fazie tworzenia szkliwa, ich niezmienność ewolucyjna (podobny skład u innych gatunków np. u rekinów) świadczy o ich niezwykle istotnej roli w procesie krystalizacji oraz regulacji wzrostu kryształów apatytów szkliwa [23]. Ponadto systematyczna degradacja zarówno amelogenin, jak i enamelin w trakcie całej fazy sekrecyjnej rozwoju szkliwa wskazuje na istotność funkcji tych białek w regulacji wzrostu i dojrzewania tkanki, a ich wzajemna zależność może odpowiadać za wzrost, orientację przestrzenną pryzmatów oraz odkładanie substancji międzypryzmatycznej [53].

Kolejne białko biorące udział w tworzeniu organicznej macierzy szkliwa to ameloblastyna (m.cz. 62 kDa) zlokalizowana głównie na obrzeżach pryzmatów szkliwnych. Funkcja ameloblastyny w amelogenezie pozostaje niejasna. Istnieją przypuszczenia, iż pełni ona rolę cząstki sygnalizacyjnej w pochewce Hertwiga oraz ze względu na jej umiejscowienie bierze udział w tworzeniu połączeń pryzmat-pryzmat [65]. W amelogenezie niezwykle istotną rolę odgrywa degradacja białek poprzez specyficzne dla szkliwa enzymy należące do dwóch grup. Są to metaloproteazy i proteazy seryny [19,41,46,60]. Występujące

w wysokim stężeniu w fazie sekrecyjnej amelogenezy metaloproteazy, których głównym przedstawicielem jest enamelizyna, prawdopodobnie regulują przebieg apozycyjnego odkładania szkliwa wybiórczo, właśnie w fazie sekrecyjnej, na co wskazuje gwałtowny spadek ich stężenia w kolejnych fazach amelogenezy, czyli przejściowej oraz dojrzewania szkliwa [9]. Odmiennie przebiega krzywa aktywności proteazy serynowej macierzy szkliwa – 1, której stężenie w fazie sekrecyjnej utrzymuje się na niskim poziomie, gwałtownie wzrasta natomiast w fazie przejściowej i utrzymuje plato na wysokim poziomie w fazie dojrzewania [10]. Na podstawie powyższych obserwacji przyjęto założenie, iż proteaza serynowa odpowiada za degradację białek, głównie z grupy amelogenin w fazie sekrecyjnej amelogenezy, a tym samym pośrednio moduluje wzrost i dojrzewanie pryzmatów szklivnych [19,52,60]. Podstawowym składnikiem zmineralizowanego szkliwa są kryształy hydroksyapatytów zawierające w swoim składzie fosforany wapnia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Dokładnie nie wiadomo, co jest donorem i jaka jest droga transportu wapnia do ameloblastów, a następnie w okolicę frontu mineralizacji. Badania wykazały pozytywną immunoreaktywność ameloblastów dla dwóch białek wiążących wapń: parwalbuminy PV (m. cz. 12 kDa) oraz witamino D_3 -zależnej kalbindyny CB D28k (m.c. 28 kDa). Pierwsze ślady obecności obydwu białek w części podstawnej ameloblastów zanotowano we wczesnej fazie sekrecyjnej amelogenezy. W trakcie postępu procesu mineralizacji parwalbumina i kalbindyna D28k „przemieszczane” były w kierunku wypustki Tomesa, aż do „wysycenia” całej objętości aktywnego ameloblasta [11, 12, 13, 14]. Fakt ekspresji obydwu białek u szczura jedynie w ameloblastach oraz prawdopodobnie w komórkach warstwy pośredniej, odpowiedzialnych za dostarczenie składników odżywczych dla ameloblastów narzuca przypuszczenie, iż parwalbumina i/lub kalbindyna D28k mogą być bezpośrednio związane z procesem mineralizacji szkliwa. Istnieją przypuszczenia, iż zarówno kalbindyna D28k, jak i parwalbumina pełnią istotną funkcję w utrzymaniu określonego, wysokiego, ale niecytotoksycznego stężenia jonów wapniowych w komórkach macierzystych szkliwa [17, 18, 27, 34, 45]. Obserwacje dotyczące gwałtownego spadku ilości CB D28k w dojrzałych ameloblastach fazy dojrzewania szkliwa sugeruje, że teoria „transportu” jonów wapniowych przez kalbindynę D28k nie jest tak pewna, jak pierwotnie przypuszczano [35, 36], oraz zważywszy, iż obecnie przeważa teoria roli buforującej dla białek wiążących wapń, być może główna rola zarówno CB D28k, jak i PV polega właśnie na buforującej ochronie ameloblasta przed wzrastającym, potencjalnie cytotoksycznym stężeniem jonów wapniowych.

Pod koniec fazy sekrecyjnej i w fazie przejściowej amelogenezy następuje całkowity rozkład i usunięcie produktów degradacji większości amelogenin oraz częściowo enamelin, w miejscu których powstają porowate przestrzenie [49], szybko wypełniane się płynem zewnątrzkomórkowym zawierającym węglany, fosforany oraz jony fluorkowe i magnezowe [51]. W fazie dojrzewania dochodzi do wypełniania powstałych przestrzeni kryształami hydroksyapatytów szkliwa odkładających się w pozostałych dwóch osiach (a, b) pryzmatów, co skutkuje wzrostem pryzmatów na szerokość i grubość oraz pełną mineralizacją szkliwa.

ZAGROŻENIA WYNIKAJĄCE Z WBUDOWANIA JONÓW FLUORKOWYCH DO SIATKI KRystalicznej PRYZMATÓW SZKLIWNYCH

Jon fluorkowy wprowadzony do organizmu endogennie np. w postaci tabletek fluorkowych (suplementacja endogenna) w czasie trwania odontogenezy, wbudowywany jest bezpośrednio do siatki krystalicznej apatytów szkliwa zmieniając dwuhydroksyapatyty $[Ca_5(PO_4)_3(OH)_2]$, w hydroksyfluoroapatyty $[Ca_5(PO_4)_3(OH)_1F]$, a następnie fluoroapatyty $[Ca_5(PO_4)_3F_2]$ [5]. Ta część fluoru stanowi względnie stabilną komponentę szkliwa i może być z niego usunięta jedynie na skutek demineralizującego działania kwasów bądź abrazyj [48]. Jon fluorkowy zastępując dipol OH^- w siatce krystalicznej zmienia konfigurację przestrzenną kryształu (wynika to z mniejszej o 0,3 Å średnicy F^- od dipola OH^-), silniej wiąże sąsiadujące z nim bezpośrednio 3 jony Ca^{2+} , co skutkuje wzmożeniem krystalizacji oraz stabilności wiązań elektrostatycznych, a w konsekwencji zwiększeniem odporności kryształów apatytów na demineralizujące działanie kwasów [26, 30, 39, 43, 63]. Labilną frakcją fluoru w szkliwie stanowi uwodniona otoczka pryzmatów oraz płyny ustrojowe. Fluor w fazie uwodnionej znajdujący się w bezpośrednim sąsiedztwie pryzmatów odgrywa znaczącą rolę w profilaktyce próchnicy zębów, gdyż może natychmiast wbudowywać się w powierzchniowe warstwy zdemineralizowanej działaniem kwasów struktury szkliwa, powodując jego wtórną remineralizację [7, 33, 57]. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt gromadzenia się CaF w bezpośrednim otoczeniu pryzmatów szkliwnych, a tym samym przesunięcie stałej dysocjacji na korzyść pryzmatów [44]. Badania wskazują na gromadzenie się zjonizowanej formy fluoru w szkliwie, w fazie sekrecyjnej, przejściowej oraz fazie dojrzewania. W stadium przejściowym amelogenezy, zjonizowany fluor zawarty w fazie uwodnionej wraz z jonami wapniowymi, fosforanowymi, magnezowymi, prawdopodobnie konkurencyjnie do fosforanów oraz węglanów wapnia, zajmuje przestrzenie powstające w tkance po usuwanych komponentach organicznej macierzy, głównie amelogeninach [1], co może zaburzać mineralizację i powodować powstawanie porowatego szkliwa. Proporcjonalnie do wzrostu stężenia jonów fluorkowych w płynie zewnątrzkomórkowym, wzrasta stężenie jonów magnezu, przy jednoczesnym spadku stężenia węglanów. Taka tendencja może skutkować powstawaniem hipoplazji bądź fluorozy szkliwa [40, 42, 66, 67]. Jednak za główną przyczynę niepełnej bądź nieprawidłowej mineralizacji szkliwa uważa się zaburzenia w enzymatycznej degradacji białek tworzących organiczną macierz szkliwa, głównie amelogenin. DenBesten wykazał [22] opóźnienie degradacji amelogenin u szczurów intoksykowanych wysokimi stężeniami fluorku sodowego w wodzie pitnej, co skutkowało opóźnieniem i słabszą mineralizacją szkliwa (zawartość komponent białkowych była proporcjonalna do wysokości stężenia fluorku sodowego w wodzie pitnej). Opóźnienie rozkładu białek obserwowano do późnej fazy dojrzewania szkliwa. Spowolnienie dojrzewania szkliwa przez fluor może wiązać się z jego zdolnością zmniejszenia ilości cykli odwracalnej modyfikacji ameloblastów z formy „smooth ended” do „ruffle ended” oraz wydłużenia tych cykli, co bezpośrednio rzutuje na szybkość wycofywania ze szkliwa komponent białkowych i zastępowania ich substancją mineralną [21]. Dinkard i wsp.

w przeciwieństwie do DenBesten i wsp. oraz Aoba i wsp. obserwował zmiany w składzie aminokwasowym oraz w ilości białek macierzy szkliwa poddanego wpływowi fluoru już we wczesnej fazie sekrecyjnej [5, 20, 25]. Autorzy pozostają jednak zgodni, co do faktu znaczącego opóźnienia procesu degradacji amelogenin pod wpływem jonu fluorkowego [47, 69]. Teorię tę potwierdzają również Aoba i wsp. wykazując absorpcję macierzystych amelogenin do powierzchni apatytów szkliwa z zaznaczeniem ich silnie hamującego wpływu na wzrost kryształów apatytów szkliwa [2, 3]. 25–30% fluoru zgromadzonego w tworzącym się szkliwie może zostać usunięta w postaci nierozpuszczalnych aglomeratów z amelogeninami, jednak znacząco większa część fluoru na stałe wbudowana w siatkę krystaliczną fluoroapatytów stanowi stabilną część rezerwuaru i może hamować degradację białek macierzy [6]. Fluor wbudowany do wnętrza siatki krystalicznej apatytów zmienia jej strukturę, zwiększając siłę wiązania kryształów z białkami (amelogeninami) [6]. Cząsteczki amelogenin ulegają wówczas konformacji, co obniża „dostępność” do nich metaloproteaz i w konsekwencji uniemożliwia bądź znacząco opóźnia ich proteolityczną degradację [4, 5]. Lyaruu i wsp. zaobserwowali jedynie przejściowe zaburzenia w mineralizacji szkliwa w okresie fazy sekrecyjnej oraz brak negatywnego wpływu fluoru na białka organicznej macierzy szkliwa, natomiast Suckling i wsp. notowali bardziej nasilone objawy fluorozę szkliwa u zwierząt narażonych na intoksykację związkami fluoru od wczesnej fazy sekrecyjnej w przeciwieństwie do intoksykowanych jedynie w fazie dojrzewania szkliwa [38, 58]. Obniżenie poziomu Ca^{2+} w płynie zewnątrzkomórkowym jako następstwo obecności reaktywnych jonów fluorkowych, może powodować spadek aktywności wapniozależnych proteaz (np. metaloproteazy), biorących udział w degradacji amelogenin i zaburzać prawidłowy przebieg mineralizacji szkliwa w drodze pośredniej. Reasumując, wciąż niejasny pozostaje sposób oddziaływania fluoru na organiczną macierz szkliwa. Nie wiadomo, czy dzieje się to w wyniku swoistej reakcji z amelogeninami, czy na skutek blokowania centrów katalitycznych proteaz odpowiedzialnych za ich rozkład. Ponieważ zaburzenia morfologiczno-funkcjonalne organicznej macierzy szkliwa pozostają bezsprzecznie potwierdzoną przyczyną powstawania fluorozę szkliwa, dalsze badania mają na celu precyzyjne określenie punktu „uchwyty” fluoru oraz zdefiniowanie mechanizmu powstawania fluorozę zębów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AOBA T, FEJERSKOV O. Dental fluorosis: Chemistry and Biology. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; **13**: 155–170.
- [2] AOBA T, TANABE T, MORENO EC. Function of amelogenins in porcine enamel mineralization during the secretory stage of amelogenesis. *Adv Dent Res* 1987; **1**: 252–260.
- [3] AOBA T, TANABE T, MORENO EC. Proteins in the enamel fluid of immature porcine teeth. *J Dent Res* 1987; **66**: 1721–1726.
- [4] AOBA T, MORENO EC, KRESAK M, TANABE T. Possible roles of partial sequences at N- and C-termini of amelogenin in protein-enamel mineral interaction. *J Dent Res* 1989; **68**: 1331–1336.
- [5] AOBA T, TANABE T, MORENO EC, FUKAE M. Effects of fluoride on matrix proteins and their properties in rat secretory enamel. *J Dent Res* 1990; **69**: 1248–1255.

- [6] AOBA T. Strategies for improving the assessment of dental fluorosis: focus on chemical and biochemical aspects. *Adv Dent Res* 1994; **8**: 66–74.
- [7] ARENDS J, CHRISTOFFERSEN J, CHRISTOFFERSEN MR, SCHUTOF J. Influence of fluoride concentration on the progress of demineralization in bovine enamel at pH 4.5. *Caries Res* 1983; **17**: 455–457.
- [8] ARSENAULT L, ROBINSON BW. The dentino-enamel junction: a structural and microanalytical study of early mineralization. *Calcif Tissue Int* 1989; 45111–45121.
- [9] BARTLETT JD, SIMMER JP, XUE J, MARGOLIS HC, MORENO EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel Matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* 1996; **183**:123–128.
- [10] BARTLETT JD, XUE J, MARGOLIS HC. A novel serine protease mRNA isolated from porcine enamel organ. *J Dent Res* 1997; 7627.
- [11] BERCHOLD MW, CELIO MR, HEIZMANN CW. Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. *J Biol Biochem* 1984; **250**: 5189–5196.
- [12] BERDAL A, HOTTON D, BALMAIN N, BREHIER A, CUISINIER-GLEIZES P, MATHIEU H. Immunological characterization, developmental pattern and Vitamin-D-dependency of calbindin D-28 K in rat teeth ameloblasts. *Differentiation* 1989; **40**: 27–35.
- [13] BERDAL A, HOTTON D, KAMYAB S, CUISINIER-GLEIZES P, MATHIEU H. Subcellular co-localization and co-variations of the two vitamin D-dependent proteins in rat ameloblasts. *Arch Oral Biol* 1991; **36**:715–725.
- [14] BERDAL A, NANJI A, SMITH CE, AHLUWALIA JP, THOMASSET M, CUISINIER-GLEIZES P, MATHIEU H. Differential expression of calbindin-D 28 kDa in rat incisor ameloblasts throughout enamel development. *Anat Rec* 1991; **230**: 149–163.
- [15] BOUROPOULOS N, MORADIAN-OLDAK J. Induction of apatite by the cooperative effect of amelogenins and the 32-kDa enamelin. *J Dent Res* 2004; **83**: 278–282.
- [16] BROOKES SJ, ROBINSON C, KIRKHAM J, BONASS WA. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing enamel. *Arch Oral Biol* 1995; **40**: 1–14.
- [17] CELIO MR, NORMAN AW, HEIZMANN CW. Vitamin-D-dependent calcium-binding-protein and parvalbumin occur in bones and teeth. *Calcif Tissue Int* 1984; **36**:129–130.
- [18] CHEN WY, NANJI A, SMITH CE. Immunoblotting studies on artificial contamination of enamel homogenates by albumin and other proteins. *Calcif Tissue Int* 1995; **57**: 145–151.
- [19] DENBESTEN PK, HEFFERNAN LM. Separation by polyacrylamide gel electrophoresis of multiple proteases in rat and bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1989; **34**: 399–404.
- [20] DENBESTEN PK, CRENSHAW MA. The effects of chronic high fluoride levels on forming enamel in the rat. *Arch Oral Biol* 1984; **29**: 675–679.
- [21] DENBESTEN PK, CRENSHAW MA, WILSON MH. Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. *J Dent Res* 1985; **64**: 1365–1370.
- [22] DENBESTEN PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res* 1986; **65**: 1272–1277.
- [23] DEUTSCH D, PALMON A, FISHER LW, KOLODNY N, TERMINE JD, YOUNG MF. Sequencing of bovine enamelin („tuftelin”) a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* 1991; **226**: 16021–16028.
- [24] DEUTSCH D, DAFNI L, PALMON A, HEKMATI M, YOUNG MF, FISHER LW. Tuftelin: enamel mineralization and amelogenesis imperfecta. W: Chichester: John Wiley&Sons 1997: 135–155.
- [25] DRINKARD CR, CRENSHAW MA, BAWDEN JW. The effect of fluoride on the electrophoretic patterns of developing rat molar enamel. *Arch Oral Biol* 1983; **12**: 1131–1134.
- [26] ELLIOTT JC. Recent progress in the chemistry, crystal chemistry and structure of apatites. *Calcif Tissue Res* 1969; **3**: 293–307.
- [27] ELMS TN, TAYLOR AN. Calbindin-D28 kappa localization in rat molar during odontogenesis. *J Dent Res* 1987; **66**: 1431–1434.
- [28] FINCHAM AG, MORADIAN-OLDAK J. Recent advances in amelogenin biochemistry. *Connect Tissue Res* 1995; **32**: 119–124.
- [29] FINCHAM AG, SIMMER JP. Amelogenin proteins of developing dental enamel. W: Chadwick DJ, Cardew G, Eds. Dental enamel. Chichester John Wiley & Sons, 1997: 118–134.
- [30] FRAZIER PD. X-ray diffraction analysis of human enamel containing different amounts of fluoride. *Arch Oral Biol* 1967; **12**: 35–42.
- [31] FUKAE M, TANABE T, UCHIDA T, YAMAKOSHI Y, SHIMIZU M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int* 1993; **53**: 257–261.

- [32] FUKAE M, TANABE T, MURAKAMI C, DOHI N, UCHIDA T, SHIMIZU M. Primary structure of the porcine 89 kDa enamel. *Adv Dent Res* 1996; **10**: 111–118.
- [33] HELLWIG E, LUSSI A. What is the optimum fluoride concentration needed for the remineralization process? *Caries Res* 2001; **35**: 57–59.
- [34] HOTTON D, DAVIDEAU JL, BERNAUDIN JF, BERDAL A. *In situ* hybridization of calbindin-D 28k transcripts in undecalcified section of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res* 1995; **32**: 137–143.
- [35] HUBBARD MJ, KON JC. Proteomic analysis of dental tissues. *J Chromatography B* 2002; **771**: 211–220.
- [36] HUBBARD MJ. Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; **11**: 437–466.
- [37] JESSEN H. Elliptical tubules as unit structure of forming enamel Matrix in the rat. *Arch Oral Biol* 1968; **13**: 351–352.
- [38] LYARUU DM, DE JONG M, BROCKERS AL, WOLTGENS JH. Ultrastructure of *in vitro* recovery of mineralization capacity of fluorotic enamel Matrix in hamster tooth germs pre-exposed to fluoride in organ culture during the secretory phase of amelogenesis. *Arch Oral Biol* 1987; **32**: 107–115.
- [39] MACIEJEWSKA I, ADAMOWICZ-KLEPAŁSKA B. Influence of low and high doses of fluoride on tooth germ development in rats. *Folia Morphol* 2000; **59**: 307–310.
- [40] MASCARENHAS AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000; **22**: 269–277.
- [41] MORADIAN-OLDAK J, SIMMER JP, SARTE PE, ZEICHNER DM, FINCHAM AG. Specific cleavage of a recombinant murine amelogenin by a proteinase isolated from bovine tooth enamel. *Arch Oral Biol* 1994; **39**: 647–656.
- [42] MURRAY JJ, RUGG-GUNN AJ, JENKINS GN. Epidemiology and measurement of dental fluorosis. W: Fluoride in caries prevention. Oxford: Wright 1991: 222–261.
- [43] OBERSZTYN A, TRYKOWSKI J. Wybrane zagadnienia dotyczące reakcji jonu fluorkowego ze szkliwem. *Stomat* 1983; **36**: 485–491.
- [44] OGAARD B. CaF₂ formation: Cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001; **35**: 40–44.
- [45] ONISHI T, OOSHIMA T, SOBUE S, TABATA MJ, KURISU K, WAKISAKA S. Calbindin D28k-like immunoreactivity during the formation the enamel-free area in the rat molar teeth. *Anat Res* 2000; **258-4**: 384–390.
- [46] OVERALL CM, LIMEBACK H. Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. *Biochem J* 1988; **256**: 965–972.
- [47] RICHARDS A, KRAGSTRUP J, JOSEPHSEN K, FEJERSKOV O. Dental fluorosis development in post-secretory enamel. *J Dent Res* 1986; **65**: 1406–1409.
- [48] ROBINSON C, CONNELL S, KIRKHAM J, BROOKES SJ, SHORE RC, SMITH AM. The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Res* 2004; **38**: 268–276.
- [49] ROBINSON C, FUCHS P, DEUTSCH D, WEATHERELL JA. Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. *Caries Res* 1978; **12**: 1–11.
- [50] ROBINSON C, FUCHS P, WEATHERELL JA. The appearance of developing rat incisor enamel using freeze-fracturing technique. *J Cryst Growth* 1981; **53**: 160–165.
- [51] ROBINSON C, KIRKHAM J, BRIGGES HD, ATKINSON PJ. Enamel proteins: from secretion to maturation. *J Dent Res* 1982; **61**: 1490–1495.
- [52] ROBINSON C, KIRKHAM J. The effect of fluoride on the developing mineralised tissues. *J Dent Res* 1990; **69**: 685–691.
- [53] ROBINSON C, KIRKHAM J, BROOKES SJ, BONASS WA, SHORE RC. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 1995; **39**: 145–152.
- [54] ROBINSON C, BROOKES SJ, KIRKHAM J, BONASS WA, SHORE RC. Crystal growth in dental enamel: The role of amelogenins and albumin. *Adv Dent Res* 1996; **10**: 64–71.
- [55] ROBINSON C, BROOKES SJ, BONASS WA, SHORE RC, KIRKHAM J. Enamel maturation. W: Wiley, Chichester 1997: 156–174.
- [56] ROBINSON C, BROOKES SJ, SHORE RC, KIRKHAM J. The developing enamel Matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 1998; **106**: 282–291.
- [57] SJOGREN K. How to improve oral fluoride retention? *Caries Res* 2001; **35**: 14–17.

- [58] SUCKLING GW, THURLEY DC, NELSON DGA. The macroscopic and scanning electron-microscoping appearance and microhardness of the enamel, and the related histological changes in the enamel organ of erupting sheep incisors resulting from prolonged low daily dose of fluoride. *Arch Oral Biol* 1988; **33**: 361–373.
- [59] TANABE T, AOBA T, MORENO EC, FUKAE M, SHIMIZU M. Properties of phosphorylated 32 kDa nonamelogenin proteins isolated from porcine secretory enamel. *Calcif Tissue Int* 1990; **46**: 205–215.
- [60] TANABE T, FUKAE M, UCHIDA T, SHIMIZU M. The localisation and characterisation of proteinases for the initial cleavage of porcine amelogenin. *Calcif Tissue Int* 1992; **51**: 213–217.
- [61] TERMINE JD, BELCOURT AB, CHRISTNER PJ, CONN KM, NYLEN MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem* 1980; **255**: 9760–9768.
- [62] TRAVIS DF, GLIMCHER MJ. The structure and organization of and the relationship between the organic matrix and the inorganic crystals of embryonic bovine enamel. *J Cell Biol* 1964; **23**: 447–497.
- [63] TRYKOWSKI J, OBERSZTYN A. Rola fluoru w utrzymaniu kariostazy. *Czas Stomat* 1983; **36**: 817–823.
- [64] UCHIDA T, TANABE T, FUKAE M, SHIMIZU M, YAMADA M, MIAKE K, KOBAYASHI S. Immunohistochemical and immunohistochemical studies using antisera against porcine 25 kDa amelogenin, 89 kDa enamelin and 13–17 kDa nonamelogenins on immature enamel of the pig and rat. *Histochemistry* 1991; **96**: 129–138.
- [65] UCHIDA T, FUKAE M, TANABE T, YAMAKOSHI Y, SATODA T, MURAKAMI C, TAKAHASHI O, SHIMIZU M. Immunohistochemical and immunocytochemical study of the 15 kDa non-amelogenin and related proteins in the porcine immature enamel: proposal of a new group of enamel proteins „sheath proteins”. *Biomed Res* 1995; **16**: 131–140.
- [66] VIEIRA AP, HANCOCK R, LIMEBACK H, MAIA R, GRYNPAS MD. Is fluoride concentration in dentin and enamel a good indicator of dental fluorosis? *J Dent Res* 2004; **83**: 76–80.
- [67] VIEIRA AP, HANCOCK R, LIMEBACK H, SCHWARTH M, GRYNPAS MD. How does fluoride concentration in the tooth affect apatite crystal size? *J Dent Res* 2003; **82**: 909–913.
- [68] WARSHAWSKY H. A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of rat incisors. *Anat Rec* 1971; **169**: 559–584.
- [69] WRIGHT JT. Hereditary defects of enamel. W: Robinson C, Kirkham J, Shore RC. (ed) Dental enamel formation to destruction. CRC Press, Boca Raton, Fl: 193–222.
- [70] YAMAKOSHI Y. Carbohydrate moieties of porcine 32 kDa enamel. *Calcif Tissue Int* 1995; **56**: 323–330.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 01.03. 2005 r.

Przyjęto: 21.09. 2005 r.

80-208 Gdańsk, ul. Orzeszkowej 18

e-mail: Izabelam@amg.gda.pl

WYBRANE ASPEKTY POWSTAWANIA ORGANICZNEJ MACIERZY MINERALIZOWANYCH TKANEK ZĘBA ORAZ ZMIANY JEJ FIZJOLOGII SPOWODOWANE WPLYWEM ENDOGENNEJ PROFILAKTYKI FLUORKOWEJ. CZĘŚĆ II. ZĘBINA

THE ASPECTS OF THE FORMATION OF EXTRACELLULAR MATRIX
IN MINERALIZED TISSUES INCLUDING THE DISTURBANCES
CAUSED BY FLUORIDE. PART II. DENTIN

Izabela MACIEJEWSKA, Zdzisław BEREZNOWSKI

Zakład Implantoprotetyki Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie: Powstawanie i mineralizacja zębiny przebiega w ściśle określony sposób. Apozycyjne odkładanie zębiny rozpoczyna się od wydzielania przez odontoblasty do przestrzeni zewnątrzkomórkowej kolagenu głównie typu I, będącego główną komponentą organicznej macierzy zębiny i tworzącego swoiste rusztowanie dla kryształów hydroksyapatytów. Mineralizacja zębiny rozpoczyna się od wydzielania bezpośrednio w okolicę tzw. frontu mineralizacji niekolagenowych białek o kwaśnym charakterze mających zdolność tworzenia z włóknami kolagenu wiązań kowalencyjnych, przy jednoczesnym silnym powinowactwie do jonów wapniowych. Dane z piśmiennictwa dowodzą, iż dla prawidłowej mineralizacji zębiny niezbędne jest współdziałanie wszystkich zarówno kolagenowych, jak i niekolagenowych białek biorących udział w tworzeniu organicznej macierzy. Jednym z pierwiastków mogących zaburzać to współdziałanie jest fluor wprowadzony do organizmu np. w postaci tabletek fluorkowych w trakcie tworzenia zębiny. W pracy opisano mechanizm tworzenia organicznej macierzy zębiny z uwzględnieniem najbardziej istotnych białek. Szczególną uwagę zwrócono na etapy w metabolizmie tych białek, na które fluor może wywierać niekorzystny wpływ powodując zaburzenia w prawidłowej mineralizacji zębiny.

Słowa kluczowe: macierz organiczna, zębina, fluorek.

Summary: The dentin formation and mineralization proceeds in the defined; matrix-mediated manner. It begins from the secretion of the organic matrix and ends with the complete mineral deposition. The dentin apposition takes place when odontoblasts begin the secretion of type I collagen into the extracellular compartment. Type I collagen is the main component of the dentin extracellular organic matrix and forms the specific scaffold for the deposition of dentin hydroxyapatite crystals. The dentin mineralization begins from the secretion of noncollagenous proteins directly at the mineralization front. These

noncollagenous, strongly acidic proteins are able to bind covalently to type I collagen fibrils. Concurrently they have the strong affinity to calcium ions. The available data confirm that the right interaction between collagen and noncollagenous proteins secretion as well as mineral deposition is the prerequisite for the complete dentin mineralization. The fluoride hypersupplementation when provided internally can alter this coordination. The mechanism of the formation of dentin extracellular matrix has been described. We focused our attention on the metabolism of the most important dentin matrix protein and emphasized the stages in the proteins metabolism which can be adversely affected by fluoride leading to the subsequent disturbances in the proper mineralization of dentin.

Keywords: extracellular matrix, fluoride, dentin.

Zębina jest zmineralizowaną tkanką zęba, której apozycyjne odkładanie trwa przez cały okres życia osobniczego w przeciwieństwie do szkliwa odkładanego do czasu ostatecznego ukształtowania korony zęba. Stopień zmineralizowania dojrzałej zębiny wynosi około 70%, związki organiczne stanowią 20%, woda 10%. Zębina jest strukturą bezkomórkową, zbudowaną z kryształów apatytów odkładających się wokół tzw. kanalików zębinowych i tworzących zębinę około- i międzykanalikową. W kanalikach zębinowych znajdują się włókna Tomesa będące wypustkami odontoblastów, odpowiedzialnych za tworzenie zębiny. Odontoblasty, pomimo iż są komórkami macierzystymi dla zębiny, różnicują się z komórek ektomezodermalnych brodawki zębowej, a tym samym morfologicznie należą do miazgi zęba. Poprzez wypustki cytoplazmatyczne zwane włóknami Tomesa, odontoblasty wydzielają składniki niezbędne do budowy zębiny, w tym białka budujące organiczną macierz zębiny [10,13,38,46]. Mineralizacja zębiny odbywa się poprzez odkładanie głównie hydroksyapatytów w kuliste struktury, tzw. kalkosferyty. Zębina granicząca bezpośrednio z odontoblastami nosi nazwę przezębiny. Odkładana przez całe życie przezębina, zbudowana jest głównie z organicznej macierzy tworzonej przez kolagen i białka niekolagenowe.

W dalszych etapach rozwoju i odkładania kolejnych warstw przezębiny, odontoblasty oddalają się od granicy szkliwno-zębinowej w kierunku miazgi zęba, natomiast przezębina ulega mineralizacji tworząc zmineralizowaną zębinę. Miejsce przejścia przezębiny w mineralizowaną zębinę nazwano frontem mineralizacji. Zrębem dla zębiny jest wydzielany przez preodontoblasty kolagen typu I oraz w znacznie mniejszej ilości kolagen typu V, stanowiące główną komponentę organicznej macierzy zębiny [4,7,45]. Kolagen typu III nie występuje w zębinie ze względu na możliwość blokowania mineralizacji tkanki [7, 45]. Pozostałe, niekolagenowe białka zębiny to spotykane również w innych tkankach proteoglikany, takie jak: osteokalcyna, osteonektyna, osteopontyna, sialoproteina kostna, dekoryn, proteina zębinowej macierzy-I oraz dwa białka charakterystyczne jedynie dla zębiny – fosfoproteina zębinowa (DDP) i sialoproteina zębinowa (DSP), obydwa do niedawna uznawane jako wytwarzane i wydzielane jedynie przez odontoblasty oraz preameloblasty [5,12]. Z najnowszych doniesień Qin i wsp. wynika, że DSP jest wytwarzana również w kości, jakkolwiek jej stężenie w tkance kostnej określono na około 400-krotnie mniejsze niż w zębinie [32]. W badaniach D'Souza i wsp. stwierdzono ekspresję DSP również w komórkach miazgi zęba, jednak brak mRNA dla syntezy DSP w miazdze sugeruje, że ekspresja DSP w komórkach miazgi zęba jest skutkiem endocytozy [13,36]. Wydzielany przez odontoblasty kolagen typu I tworzy swoistą organiczną siatkę pierwotnie niezmineralizowanej zębiny.

Występujące w znacząco mniejszej ilości (około 15%) włókna kolagenu typu V układają się poprzecznie w stosunku do włókien kolagenowych typu I tworząc kowalencyjne wiązania poprzeczne [31,50]. W takiej właśnie „siatce” kolagenowej odkładane są w trakcie mineralizacji kryształy apatytów zębiny. Niekolagenowe białka wchodzące w skład organicznej macierzy zębiny głównie fosfoproteiny zębiny (DPP), wiążąc się za pomocą wiązań kowalencyjnych do włókien kolagenowych, w ściśle określonych miejscach o silnie dodatnim ładunku tzw. „bramkach”, mają zdolność inicjacji tworzenia kryształów apatytów [39,42]. Z powyższych obserwacji wynika, iż matryca rozkładu kryształów apatytów w zębinie jest bezpośrednio zależna od struktury przestrzennej włókien kolagenowych [11].

Do głównych niekolagenowych białek charakterystycznych dla zębiny należą fosfoproteina zębinowa (DPP) oraz sialoproteina zębinowa (DSP). DPP po kolagenie jest najobficiej występującym białkiem organicznej macierzy zębiny [11,12]. Masa cząsteczkowa DPP różni się znacząco u poszczególnych gatunków i wynosi 155 kDa dla bydła, 72 kDa dla myszy, 90 lub 38 kDa dla szczura. Różnice w precyzyjnym określeniu masy cząsteczkowej wynikają prawdopodobnie z zastosowanych metod badawczych [20]. Dla człowieka masa cząsteczkowa DPP wynosi 140 kDa. Komórkami odpowiedzialnymi za wytwarzanie DPP są odontoblasty oraz preameloblasty. DPP wydzielana jest do płynu zewnątrzkomórkowego otaczającego tworzący się pryzmat, poprzez wypustki odontoblastów zwane włóknami Tomesa, w miejscu oddalonym około 10–20 μm od miejsca granicy szkliwno-zębinowej nazwanym frontem mineralizacji [22,34]. Tam tworząc elektrostatyczne wiązania z włóknami kolagenu w środowisku jonów wapniowych i fosforanowych, inicjuje powstawanie kryształów apatytów zębiny [21]. Charakterystyczną cechą fosfoproteiny zębiny jest wysoka zawartość fosfoseryny (45–50%) oraz kwasu asparaginowego (35–38%) nadających jej silnie kwaśny charakter. Punkt izoelektryczny dla DPP wynosi 1,1 [12]. Butler i wsp. wykazali występowanie trzech różnych form DPP zależnych od stopnia fosforylacji białka [8]. Są to formy wysokofosforylowana (HP) zawierająca około 50% reszt fosforowych, średniofosforylowana (MP) około 25% oraz niskofosforylowana (LP). Stopień fosforylacji DPP zdaje się odgrywać znaczącą rolę w mineralizacji zębiny, gdyż jedynie ufosforylowane białko ma zdolność krystalizacji kryształów apatytów zębiny [51]. W badaniach Marsh [26] wykazano jednoznacznie, że jedynie fosfoproteina o wysokim stopniu fosforylacji tworzy w środowisku jonów wapnia nierozpuszczalne kuliste kompleksy. Przy nasyceniu roztworu jonami wapnia równej 65% dochodzi w łańcuchach DPP do powstania wewnętrznych, kowalencyjnych wiązań poprzecznych. Liczba wiązań wzrasta proporcjonalnie do stopnia nasycenia roztworu jonami wapnia. Przy 100% nasyceniu roztworu wysokofosforylowana forma DPP może przyłączyć maksymalnie 1,33 jonu wapnia przypadających na jedną resztę fosforanową [26]. Tak silne powinowactwo do jonów wapniowych redukuje kwaśny charakter HP DPP. George i wsp. po dokonaniu analizy struktury końca COOH dla DPP oraz przejrzeniu biblioteki cDNA odontoblastów stwierdzili, że najczęściej powtarzającą się sekwencją 245 reszt aminokwasowych była triada Asp-Ser-Ser oznaczana jako DS*S* dla uwzględnienia fosforylacji seryny [14]. Na tej podstawie wysnuto wniosek, że fosforylowane reszty seryny zajmują miejsce na dwóch przeciwstawnych biegunach łańcucha głównego DPP, a reszty karboksylowe

kwasy asparaginowe tworzą dwa przeciwstawne wobec siebie brzegi „biegnące” równolegle do brzegów z reszt fosforanowych. Znacznie rzadziej występująca sekwencja końca terminalnego – COOH w DPP, składająca się z sekwencji S*D wykazuje strukturę dwóch zjonizowanych krańców w łańcuchach przestrzennych, gdzie grupy fosforanowe zgrupowane są na jednym końcu, a karboksylowe na końcu przeciwnym. Powyższe fakty wskazują, że fosfoproteina zębiny mająca silne powinowactwo do wiązania jonów Ca^{2+} , przyłączając się do kolagenu tworzy trójwymiarową strukturę reszt karboksylowych i fosforanowych, co przyczynia się do inicjacji krystalizacji kryształów hydroksyapatytów. W literaturze światowej istnieje zgodność dotycząca roli DPP w inicjacji procesu krystalizacji hydroksyapatytów zębiny [2,39]. Większość autorów uważa również, iż w późnej fazie sekrecyjnej oraz przejściowej i dojrzewania zawiązka zęba DPP i/ oraz DSP stają się inhibitorami wzrostu kryształów apatytów oraz przyczyniają się do wydłużania okresu dojrzewania zębiny [3,41,43].

Drugim białkiem charakterystycznym dla zębiny jest sialoproteina zębinowa (DSP). DSP wytwarzana jest przez młode, sekrecyjne odontoblasty. Nie stwierdzono ekspresji sialoproteiny zębinowej w preodontoblastach. Potwierdzono natomiast jej obecność również w preameloblastach, przębinie i zębinie [5,9,13]. Szczególnie duże wysycenie DSP oznaczono w wypustce Tomesa odontoblastów, co mogłoby sugerować udział DSP w procesie mineralizacji [36]. DSP stanowi 5–8% zawartości zębiny. Jej masa cząsteczkowa oznaczona została na 53 kDa, jakkolwiek, w czasie elektroforezy niejednokrotnie identyfikowana jest jako 95 lub 210 kDa ze względu na silne ufosforylowanie (6,2 reszt fosforanowych/cząsteczkę) [33]. DSP zawiera 30% reszt węglowodanowych oraz 10% kwasu sialowego, jest bogata w glutaminę, asparaginę, serynę oraz glicynę [11,12]. Analiza genomu szczura wykazała istnienie dwóch form DSP. Funkcja, jaką pełni DSP w powstawaniu zębiny, nie została dotychczas poznana, jednak fakt kodowania DPP oraz DSP jako jednej sekwencji (rozdzielanej później na dwa różne białka) w chromosomie 4 genomu człowieka oraz 5 szczura oraz równoczesne pojawianie się DSP i DPP na froncie mineralizacji natychmiast po utworzeniu kolagenowej macierzy zębiny, a także ekspresja immunohistochemiczna DSP w odontoblastach i preameloblastach nasuwa przypuszczenie, że DSP w powiązaniu z DPP może pełnić znaczącą rolę w procesie mineralizacji zarówno zębiny, jak i szkliwa [23,35,36]. Prowadzone *in vitro* próby samoistnej krystalizacji hydroksyapatytów na powierzchni DPP i DSP dały wynik dla DSP znacząco słabszy w porównaniu z wynikiem DPP [2], dlatego przewiduje się możliwość pełnienia przez DSP roli białka regulatorowego (tzw. cząsteczki sygnalizacyjnej) we wzajemnym stymulacyjnym oddziaływaniu tkanki mezenchymatycznej (zębiny) oraz ektodermalnej (szkliwa) [12,13].

Kolejnym białkiem pierwotnie uznanym za specyficzne jedynie dla zębiny (występuje w odontoblastach sekrecyjnych) jest białko zębinowej macierzy-1 (DMP-1). Niedawno zostało ono jednak wykryte również jako białko składowe organicznej macierzy kości. Masę cząsteczkową DMP-1 określono na 175–200 kDa, jednak ze względu na małą stabilność białka produkty jego rozpadu najczęściej są identyfikowane na poziomie 57 kDa. Jego silnie kwaśny charakter spowodowany wysoką zawartością kwasu asparaginowego oraz glutaminowego, a także silne powinowactwo do jonów wapnia sugeruje, iż obok DPP i DSP DMP-1 bierze czynny udział w tworzeniu apatytów zębiny [11,15].

Badania *in vitro* potwierdziły, że DMP-1 wiążąc się w określonych końcach N-telopeptydu z kolagenem typu I powoduje zmianę konformacji przestrzennej włókien kolagenowych budujących organiczny zrąb zębiny oraz ułatwia odkładanie się apatytów zębiny jedynie w tzw. brankach kolagenowych utworzonych w miejscu wiązania DMP-1 [16,40]. DMP-1 uważa się również za białko biorące udział w mineralizacji zębiny [6].

Poza wyżej wymienionymi, organiczną macierz zębiny tworzy szereg innych białek, np. sialoproteina kostna czy osteokalcyna, których funkcja dla dentinogenezy jest bądź mniej znacząca, bądź też dotychczas nieznana. Jednakże fakt, iż występują one również w innych tkankach pochodzenia mezodermalnego, np. w tkance kostnej może sugerować, że w obydwu tkankach pełnią zbliżoną rolę.

ZAGROŻENIA W MINERALIZACJI ZĘBINY WYNIKAJĄCE Z EKSPOZYCJI NA JON FLUORKOWY

Fakt słabszej mineralizacji, a tym samym większego uwodnienia zębiny niż szkliwa sugeruje, iż jon fluorowy w zębinie gromadzi się w niej w większej ilości [44]. Milhaud i wsp. wykazał dwukrotnie większą koncentrację fluoru w zębinie niż szkliwie zwierząt przewlekłe intoksykowanych fluorem w paszy [29]. Jednakże w piśmiennictwie spotyka się znacząco mniej doniesień dotyczących wpływu fluoru na zębinę. Appleton obserwował, że duże dawki fluoru zawarte w paszy skutkowały poważnymi zaburzeniami mineralizacji zębiny, co objawiało się powstawaniem rozległych przestrzeni międzykulistych wypełnionych białkami organicznej macierzy zębiny oraz zatarciem granicy pomiędzy niezmineralizowaną przezębiną a zmineralizowaną zębiną [1]. Jarzynka i wsp. oprócz rozległych przestrzeni międzykulistych zauważyła szerokie prążki odwapnienia identyfikujące rejony słabszej mineralizacji [17,18,19]. W badaniach własnych zanotowano statystycznie istotnie większą objętość frakcji zębiny w grupie zwierząt pijących wodę ze śladową zawartością fluoru w porównaniu ze zwierzętami pojonymi wodą z małym (10 mg/l) lub wysokim (110 mg/l) stężeniem fluorku sodowego [25]. Badania wpływu fluoru na organiczną macierz zębiny wykazały zmiany zarówno w ekspresji kolagenu typu I będącego głównym organicznym budulcem zębiny, jak i białek niekolagenowych powstających w zębinie w okresie jej tworzenia i mineralizacji [30]. Veron i wsp. wykazał, w hodowlach komórkowych miazgi zęba traktowanych fluorem o stężeniu 10 ppm, 16-krotny spadek ilości m-RNA dla łańcucha $\alpha 1(I)$ kolagenu, przy jednoczesnym ograniczonym wpływie fluoru na ekspresję $\alpha 2(I)$ oraz $\alpha 1(III)$ [47]. Badania ostatnich lat udowodniły blokowanie przez fluor posttranslacyjnej fosforylacji fosfoproteiny zębinowej (DPP) jako skutek obniżenia aktywności fosfatazy alkalicznej, a także wzmocnienia aktywności kinazy kazeinowej II będących bezpośrednio odpowiedzialnych za ostateczną fosforylację DPP [27,28]. Zmniejszenie ilości grup fosforanowych w DPP obniża jej zdolność do przyłączania jonów wapniowych, a tym samym mineralizację zębiny. Wstępne badania własne wskazują również na fluorozależną zmianę w ekspresji sialoproteiny zębinowej (DSP) w związkach zębów szczura [24].

Podobnym modyfikacjom podlegają inne, niekolagenowe białka zębiny – proteoglikany. Badania hodowli tkankowych prowadzone w środowisku fluoru wykazały istotne obniżenie ekspresji oraz skrócenie czasu żywotności drobnocząsteczkowych białek bogatych w lisinę typu I (SLRPs) w komórkach miazgi zęba oraz przyspieszoną substytucję dwuglikanu w siarczan dermatanu w przębinie, a następnie w siarczan chondroityny w zębinie [48]. Doniesienia ostatnich lat wskazują na silny wpływ środowiska fluorkowego na posttranslacyjną modyfikację glikoaminoglikanów, polegającą na skróceniu ich łańcucha, co z kolei zaburza fibrogenezę włókien kolagenowych organicznej macierzy zębiny [49]. Najnowsze doniesienia Vieira i wsp. [44] wskazują korelację pomiędzy stężeniem fluoru w zębinie a zmianami morfologicznymi w pryzmatach szkliwa będącymi skutkiem tabletkowej suplementacji fluorkowej, dlatego aktualne badania skierowane są na ustalenie wpływu fluoru na poszczególne niekolagenowe białka organicznej macierzy zębiny biorące udział w jej mineralizacji.

PIŚMIENNICTWO

- [1] APPLETON J. Formation and structure of dentine in the rat incisor after chronic exposure to sodium fluoride. *Scanning Microscopy* 1994; **8**: 711–719.
- [2] BOSKEY A, SPEVAK L, TAN M, DOTY SB, BUTLER WT. Dentin sialoprotein (DSP) has limited effects on *in vitro* apatite formation and growth. *Calcif Tissue Int* 2000; **67**: 472–478.
- [3] BOSKEY AL. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. *Ann NY Acad Sci* 1995; **21**: 249–256.
- [4] BRONCKERS AL, GAY S, LYARUU DM, GAY RE, MILLER EJ. Localization of type V collagen with monoclonal antibodies in developing dental and periodontal tissues of the rat and hamster. *Coll Relat Res* 1986; **6**: 1–13.
- [5] BRONCKERS AL, D'SOUZA RN, BUTLER WT, LYARUU DM, VAN DIJK S, GAY S, WOLTGENS JH. Dentin sialoprotein: biosynthesis and developmental appearance in rat tooth germs in comparison with amelogenins, osteocalcin and collagen type-I. *Cell Tiss Res* 1993; **272**: 237–247.
- [6] BUTLER WT, BRUNN JC, QIN C, MCKEE MD. Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect Tiss Inter* 2002; **43**: 301–307.
- [7] BUTLER WT. The structure of $\alpha 1$ chain of rat collagen. The triptic peptides from skin and dentin collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; **48**: 1540–1548.
- [8] BUTLER WT, BROWN M, DRMUZIO MT, COTHARAN WC, LINDE A. Multiple forms of dentin phosphoproteins. *Arch Biochem Bioph* 1983; **225**: 178–186.
- [9] BUTLER WT, BROWN M, BRUNN JC, D'SOUZA RN, FARACH-CARSON MC, HAPPONEN RP, SCHROHENLOHER RE, SEYER JM, SOMERMAN MJ, FOSTER RA i wsp. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDa dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 1992; **12**: 343–351.
- [10] BUTLER WT. Dentin Matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 1995; **33**: 59–65.
- [11] BUTLER WT, RITCHIE H. The nature and functional significance of dentin extracellular Matrix proteins. *Int J Biol* 1995; **39**: 169–179.
- [12] BUTLER WT. Dentin Matrix proteins. *Eur J Oral Sci* 1998; **106**: 204–210.
- [13] D'SOUZA RN, BRONCKERS AL, HAPPONEN RP, DOGA DA, FARACH-CARSON MC, BUTLER WT. Developmental expression of a 53 KD dentin sialoprotein in rat tooth organs. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 359–366.
- [14] GEORGE A, BANNON L, SABSAY B, DILLON J, MALONE J, VEIS A, JENKINS N, GILBERT D, COPELAND N. The carboxyl-terminal domain of phosphophoryn contains unique extended amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl-phosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *J Biol Chem* 1996; **271**: 32869–32873.

- [15] HAO J, ZOU B, NARAYANAN K, GEORGE A. Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone* 2004; **34**: 921–932.
- [16] HE G, GEORGE A. Dentin matrix protein I immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition *in vitro*. *J Biol Chem* 2004; **279**: 11649–11656.
- [17] JARZYŃKA W, PUT A. Wpływ przewlekłego zatrucia fluorem na obraz morfologiczny zębiny szczerza białego. *Czas Stomat* 1984; **37**: 169–175.
- [18] JARZYŃKA W, PUT A. Histomorfologiczne badania zębiny u szczurów eksponowanych na fluor. *Czas Stomat* 1982; **35**: 5–6.
- [19] JARZYŃKA W, PUT A, CEGLECKA M. Mikromorfologia zębiny siekaczy szczurów przewlekłe narażonych na działanie fluorku amonowego. *Czas Stomat* 1990; **43**: 256–260.
- [20] JONTELL M, PERTOFT H, LINDE A. Disagreement in molecular weight determination of dentin phosphoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1982; **10**: 315–320.
- [21] KUBOKI Y, FUJISAWA R, AOYAMA K, SASAKI S. Calcium-specific precipitation of dentin phosphoproteins: a new method of purification and the significance for the mechanism of calcification. *J Dent Res* 1979; **58**: 1926–1932.
- [22] LINDE A, LUSSI A, CRENSHAW MA. Mineral induction by immobilized polyanionic proteins. *Calcif Tissue Int* 1989; **44**: 286–295.
- [23] MacDOUGALL M, SIMMONS D, LUAN X, NYDEGGER J, FENG J, GU TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcripts coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 1997; **272**: 835–842.
- [24] MACIEJEWSKA I, DOMARADZKA-PYTEL B, SPODNIK JH, WÓJCIE S, BUTLER WT, BEREZNOWSKI Z. DSP developmental expression in rats tooth germ supplemented with fluoride. Abstract, Joint Meeting of CED;NOF;ID of IADR, 25-29.08.2004 Istanbul, Turkey.
- [25] MACIEJEWSKA I, ADAMOWICZ-KLEPAŁSKA B, KMIEĆ Z, DZIEWIAŃKOWSKI J. Influence of diet and fluoride on dentin and enamel deposition and maturation in rats. *Folia Morphol* 2000; **59**: 131–136.
- [26] MARSH M. Binding of calcium and phosphate ions to dentin phosphophoryn. *Biochemistry* 1989; **28**: 346–352.
- [27] MILAN AM, WADDINGTON RJ, EMBERY G. Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity *in vitro* with potential implications for dentine mineralization. *Arch Oral Biol* 2001; **46**: 343–351.
- [28] MILAN AM, WADDINGTON RJ, EMBERY G. Altered phosphorylation of rat dentine phosphoproteins by fluoride *in vivo*. *Calcif Tissue Int* 1999; **64**: 234–238.
- [29] MILHAUD GE, CHARLES E, LOUBIERE ML, KOLF-CLAUW M, JOUBERT C. Effects of fluoride on secretory and postsecretory phases of enamel formation in sheep molars. *Am J Vet Res* 1992; **53**: 7.
- [30] MOSELEY R, WADDINGTON RJ, SLOAN AJ, SMITH AJ, HALL RC, EMBERY G. The influence of fluoride exposure on dentin mineralisation using an *in vitro* organ culture model. *Calcif Tissue Int* 2003; **73**: 470–475.
- [31] NIYIBIZI C, EYRE DR. Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 943–950.
- [32] QIN C, BRUNN JC, CADENA E, RIDALL A, TSUJIGIWA H, NAGATSUKA H, NAGAI N, BUTLER WT. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 2002; **81**: 392–394.
- [33] QIN C, BRUNN JC, BABA O, WYGANT JN, MCINTYRE BW, BUTLER WT. Dentin sialoprotein isoforms: detection and characterization of the heigh molecular weight dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci* 2003; **111**: 235–242.
- [34] RITCHIE HH, HOU H, VEIS A, BUTLER WT. Cloning and sequence determination of rat dentin sialoprotein a novel dentin protein. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3698–3702.
- [35] RITCHIE HH, SHIGEYAMA Y, STRAYHORN C, HANKS CT, SOMERMAN MJ, BUTLER WT. Specific expression of DSP mRNA by odontoblasts. *J Dent Res* 1996; **75**: 153.
- [36] RITCHIE HH, BERRY JE, SOMERMAN MJ, HANKS CT, BRONCKERS AL, HOTTON D, PAPAGERAKIS P, BERDAL A, BUTLER WT. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci* 1997; **105**: 405–413.
- [37] RITCHIE HH, RITCHIE DG, WANG LH. Six decades of dentinogenesis research. *Eur J Oral Sci* 1998; **106**: 211–220.
- [38] SAITO T, ARSENAULT AL, YAMAUCHI M, KUBOKI Y, CRENSHAW MA. Mineral induction by immobilized phosphoproteins. *Bone* 1997; **21**: 305–311.
- [39] STETLER-STEVENSON WG, VEIS A. Type I collagen shows a specific binding affinity for bovine dentin phosphophoryn. *Calcif Tissue Int* 1986; **38**: 135–141.

- [40] TARTAIX PH, DOULAVERAKIS M, GEORGE A, FISHER L, BUTLER WT, QUIN C et al. *In vitro* effects of dentin matrix protein 1 on hydroxyapatites formation provide insights into *in vivo* functions. *J Biol Chem* 2004; **27**: 18115–18120.
- [41] TERMINE JD, EANES ED, CONN KM. Phosphoprotein modulation of apatite crystallization. *Calcif Tissue Int* 1980; **31**: 247–251.
- [42] TRAUB W, JODAIKIN A, ARAD T, VEIS A, SABSAY B. Dentin phosphophoryn binding to collagen fibrils. *Matrix* 1992; **12**: 197–201.
- [43] UDICH HJ, HOFT HD, BORING H. Effect of phosphoproteins on precipitation and crystallization of calcium phosphate salts. An *in vitro* study using an agar gel Matrix model. *Biomed Biochim Acta* 1986; **45**: 703–711.
- [44] VIEIRA AP, HANCOCK R, LIMEBACK H, MAIA R, GRYPAS MD. Is fluoride concentration in dentin and enamel a good indicator of dental fluorosis? *J Dent Res* 2004; **83**: 76–80.
- [45] VOLPIN D, VEIS A. Cyanogen bromide peptides from insoluble skin and dentin bovine collagens. *Biochemistry* 1973; **12**: 1452–1464.
- [46] VEIS A. Mineral-Matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Miner Res* 1993; **8**: 493–497.
- [47] VERON MH, COUBLE ML, MAGLOIRE H. Selective inhibition of collagen synthesis by fluoride in human pulp fibroblasts *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 1993; **53**: 38–44.
- [48] WADDINGTON RJ, MOSELEY R, SMITH AJ, SLOAN AJ, EMBERY G. Fluoride-induced changes to proteoglycan structure synthesised within the dentin-pulp complex *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1689**: 142–151.
- [49] WADDINGTON RJ, EMBERY G, HALL RC. The influence of fluoride on proteoglycan structure using a rat odontoblast *in vitro* system. *Calcif Tissue Int* 1993; **52**: 392–398.
- [50] YAMAUCHI M, CHANDLER GS, KATZ EP. Collagen cross-linking and mineralization. W: Chemistry and Biology of Mineralized Tissue. Elsevier, New York 1992; 39–46.
- [51] ZANETTI M, DE BERNARD B, JONTELL M, LINDE A. Ca²⁺ binding studies of the phosphoprotein from rat-incisor dentine. *Eur J Biochem* 1981; **113**: 541–545.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 01.03. 2005 r.

Przyjęto: 21.09. 2005 r.

80-208 Gdańsk, ul. Orzeszkowej 18

e-mail: lzabelam@amg.gda.pl

WSPÓLZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY METYLACJĄ CYTOZYNY I MODYFIKACJAMI CHROMATYNY

INTERRELATIONSHIP BETWEEN CYTOSINE METHYLATION AND CHROMATIN MODIFICATION

Karol STAWSKI, Grażyna DĄBROWSKA, Anna GOC

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Genetyki,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Genetyczne, biochemiczne i cytologiczne studia na temat metylacji cytozyny w DNA u organizmów eukariotycznych skłaniają do powiązania tego procesu z metylacją histonów, interferencją RNA (RNAi) i modelowaniem struktury chromatyny. Jest również oczywiste, że nie ma pojedynczej drogi objaśniającej powstawanie wszystkich znanych typów metylacji DNA u Eukaryota. W tym artykule zebrano wiedzę na temat kilku powszechnych mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę metylacji DNA.

Słowa kluczowe: metylacja cytozyny, wyciszenie genów, modyfikacje struktury chromatyny.

Summary: Genetic, biochemical and cytological studies on cytosine methylation in eukaryotic organisms indicate intriguing links between DNA methylation, histone methylation, RNA interference and chromatin remodeling. It is clear that no single pathway accounts for all DNA methylations found in Eukaryota. In this article several general mechanisms which control methylation are briefly described.

Key words: cytosine methylation, gene silencing, chromatin modification.

1. WSTĘP

Ekspresja genów u organizmów eukariotycznych zależy w głównej mierze od dostępności DNA dla czynników transkrypcyjnych. Większość genów w skondensowanej chromatinie jest nieaktywna. Za dwa główne mechanizmy odpowiadające za kontrolę ekspresji genów poprzez modulowanie struktury chromatyny uważa się metylację DNA i modyfikacje histonów. Epigenetyczne zmiany ekspresji genu odbywają się bez zmiany sekwencji DNA, a mogą być wywołane na skutek kowalencyjnego dodania grupy metylowej do cytozyny w DNA [1, 19].

Z końcem lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku metylacja DNA została rozpoznana jako ważny element epigenetyczny, który pozytywnie koreluje z transkrypcyjnym wyciszeniem genów. Większość 5-metylocytozyn w DNA u ssaków występuje w transpozonach, wewnątrzgenomowych pasożytach, które reprezentują co najmniej 30% genomu ssaków. Biologiczne znaczenie inaktywacji transpozonów nie jest dokładnie znane. Przypuszcza się, że jest to mechanizm obronny przeciwko zniszczeniom, jakie mogłyby wywołać ruchome elementy genomu w przypadku swobodnej transpozycji [73]. Wskutek przemieszczania się transpozonów mogą powstawać bardzo duże zmiany w strukturze genomów, takie jak: delecje, inwersje i duplikacje obejmujące nieraz bardzo obszerne rejony i powodujące niekiedy utratę funkcji jednych genów, a wzmoczoną ekspresję innych. Ponadto metylacja odgrywa kluczową rolę w inaktywacji chromosomu X w żeńskich tkankach somatycznych i piętnowaniu rodzicielskim, które decyduje o prawidłowym rozwoju zarodka [8, 49]. Piętnowanie genów powoduje monoalleliczną ekspresję genów w zależności od pochodzenia od jednego z rodziców. Niektóre geny są preferencyjnie piętnowane podczas spermatogenezy, a inne podczas oogenezy. Za jeden z ważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za piętnowanie genomowe uważa się metylację DNA, jednak nie można wykluczyć innych czynników epigenetycznych decydujących o modyfikacjach genomu odmiennych niż zmiana sekwencji nukleotydowej. Z uwagi na to, że metylacji DNA przypisywana jest rola w regulacji ekspresji genów, jej nieprawidłowy poziom w genach, które kodują białka uczestniczące w kontroli regulacji cyklu komórkowego, może zaburzać homeostazę komórki prowadząc między innymi do transformacji nowotworowej [5]. W komórkach nowotworowych spada ogólny poziom metylacji DNA [13], a jednocześnie dochodzi do metylacji pojedynczych wysp CpG [69].

Wykazano, że gen może ulec unieczynnieniu nie tylko poprzez delecję lub mutację punktową, ale również poprzez metylację promotora. Istnieją liczne dowody na to, że metylacja i ekspresja genów są procesami powiązаныmi ze sobą przez wiele elementów. Można wśród nich wymienić skład nukleotydowy DNA, aktywność metylotransferaz, czynniki transkrypcyjne (aktywatory i represory), nukleosomy, histony, acetylazy i deacetylazy histonów, czynniki remodulujące strukturę chromatyny, białka wiążące zmetylowany DNA i wiele innych [1, 19, 58, 65].

2. METYLACJA, METYLOCYTOZYNA, DINUKLEOTYDY CpG

Metylacja cytozyny jest konserwatywną modyfikacją DNA wśród kręgowców, roślin i niektórych grzybów katalizowaną przez metylotransferazy, które przenoszą grupy metylowe z S-adenozylometioniny na piąty atom węgla cytozyny. U zwierząt metylowanie cytozyny następuje w układzie CpG, zaś u roślin również w innych sekwencjach, takich jak symetryczna CNG lub niesymetryczna CNN (gdzie N=A, T, C lub G) [16, 43, 44]. U kręgowców niemetylowana frakcja DNA stanowi jedynie 1–2% genomu. Są to sekwencje charakteryzujące się wysoką zawartością G+C (powyżej 60%) i długością od 0,2 do 2 kpz tworzące tzw. wyspy CpG. Pozostałe dinukleotydy CpG, na

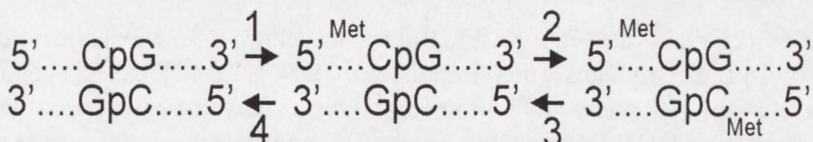
zewnątrz wysp CpG są przeważnie metylowane. W genomie kręgowców występuje niezwykle mało dinukleotydów CpG w porównaniu z oczekiwaną średnią frekwencją par CpG. Stanowi ona około 20% wartości wyliczonej na podstawie składu nukleotydów C i G. Powszechnie uważa się, że niski stopień CpG w genomie kręgowców wynika ze skłonności metylocytozyny do deaminacji [1, 26, 69]. Deaminacja 5-metylo-cytozyny prowadzi do powstania tyminy i niesparowanych zasad T/G. Jeśli mutacja nie zostanie naprawiona, w czasie replikacji w nowej nici DNA zamiast guaniny zostanie wbudowana adenina. Proces spontanicznej deaminacji cytozyny zaburza równowagę spontanicznych tranzycji zasad ($C \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow A$) i w efekcie w ssaczym DNA występuje znacznie więcej dwójek TpA i CpA niż CpG [26, 43].

Wyspy CpG są funkcjonalnie połączone ze strukturą genów. Ich występowanie w genomie pokrywa się lub sąsiaduje z końcami 5' wszystkich genów metabolizmu podstawowego i wielu genów regulowanych tkankowo lub rozwojowo. Wyspy CpG mogą występować co kilkadziesiąt tysięcy, a nawet co kilka milionów par zasad. Lokalizację wysp CpG można określić na podstawie analizy niemetylowanych miejsc restrykcyjnych zawierających dinukleotydy CpG, np. za pomocą enzymów *NotI*, *SacI* [1, 58].

3. ZMIANY POZIOMU METYLACJI DNA

Wzór metylacji DNA jest ustanawiany przez dwa przeciwstawne procesy: metylację i demetylację genomu (ryc.1). Pierwszy z nich jest enzymatyczny, a drugi polega bądź na biernym braku metylacji nici DNA powstałej w wyniku replikacji, bądź jest wynikiem niezależnych od replikacji DNA mechanizmów naprawy DNA.

Istnieją dwie kategorie metylotransferaz DNA: o aktywności *de novo* lub o aktywności zachowującej metylację w czasie kolejnych podziałów komórkowych. Ten podział nie wydaje się jednak być bezwzględny, gdyż obie grupy enzymów zachodzą na siebie funkcjonalnie. Sposób wyznaczania miejsc metylacji *de novo* nie jest dobrze poznany, ale wiadomo, że w grę wchodzi kilka potencjalnych dróg metylacji cytozyny [19, 58]. Przypuszcza się, że metylacja cytozyny w określonych sekwencjach jest zależna od składu zasad azotowych lub też od drugorzędowej struktury chromatyny. U roślin za ten proces mogą również odpowiadać cząsteczki RNA wykazujące homologię do DNA. Metylacja nierozzerwalnie wiąże się ze strukturą chromatyny, dlatego badania mechanizmów metylacji *de novo* skupiają się głównie na poznaniu czynników modyfikujących strukturę chromatyny [19, 58].



RYCINA 1. Metylacja dinukleotydu CpG. Na schemacie pokazano zależności między możliwymi poziomami metylacji CpG. 1 – metylacja *de novo*, 2 – metylacja zachowawcza (hemimetylacja), 3 i 4 – demetylacja (wg [64] – zmodyfikowany)

Metylacja *de novo* u ssaków zachodzi podczas embriogenezy, po uprzednim procesie demetylacji prawie całego genomu, który ma miejsce podczas pierwszych podziałów zapłodnionej komórki jajowej [49]. Dodatkowa metylacja *de novo* może zachodzić również później w czasie rozwoju organizmu, nawet w wyspecjalizowanych komórkach, w celu wyciszenia nabytych sekwencji prowirusowych lub w celu realizacji programu specjalizacji komórkowej. W rozwijającym się płodzie i po urodzeniu metylacja jest zjawiskiem charakterystycznym dla określonych typów komórek i tkankowo specyficznym. Zaburzenie prawidłowego wzorca metylacji może prowadzić do hipermetylacji regionów promotorowych supresorów nowotworowych. Jest to ważny mechanizm w przypadku nowotworzenia [5]. U *Arabidopsis thaliana* spadek zawartości 5-metylocytozyny powoduje głębokie zmiany w rozwoju roślin i morfologii kwiatów [44].

3.1. Mechanizm metylacji DNA u ssaków

Proces metylacji DNA ssaków opiera się na czterech niezależnie kodowanych metylotransferazach DNA: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a i Dnmt3b. Dnmt1 jest najlepiej poznaną hemimetylaza, która metyluje cytozynę w parze CpG z dużą wydajnością wtedy, gdy komplementarna sekwencja z drugiej nici jest już zmetylowana [1, 22, 72]. Jeśli oba układy dinukleotydu CpG są niezmetylowane, wydajność enzymu zmniejsza się 10- lub nawet 30-krotnie [72]. Enzym ten jest zatem odpowiedzialny za utrzymanie metylacji DNA w czasie kolejnych rund replikacji poprzedzających podziały komórkowe. Inaktywacja genu *Dnmt1* w komórkach zarodkowych, metodą homologicznej wymiany genów, prowadzi do niekontrolowanej demetylacji genomu. Zarodki homozygotyczne pod względem nieaktywnych alleli *Dnmt1* na początku dzielą się prawidłowo, jednak podczas gastrulacji dochodzi do wielu nieprawidłowości rozwojowych i w konsekwencji do śmierci płodów [35].

Inaktywacja obu alleli genu *Dnmt1* w mysich pierwotnych komórkach zarodkowych nie prowadzi jednak do całkowitego zahamowania metylacji DNA. Istnieje jeszcze jedna grupa metylotransferaz DNA metylująca cytozynę w dinukleotydach CpG o aktywności *de novo* [35]. Potwierdziło to odkrycie enzymów Dnmt3a i Dnmt3b, które nie wykazywały preferencji substratowej wobec hemimetylowanego DNA. Oba uczestniczą w metylacji *de novo* podczas bardzo wczesnych stadiów rozwojowych zarodka [22].

Dnmt3a i Dnmt1 kooperują wzajemnie w procesie metylacji DNA, ponieważ obecność obu enzymów jednocześnie podnosi pięciokrotnie szybkość metylacji. Aktywność Dnmt3a stymuluje metylację prowadzoną przez Dnmt1. Dnmt1 poprzez interakcję z Dnmt3a prawdopodobnie wpływa na przebieg procesu metylacji *de novo* [15].

Gen *Dnmt2* zidentyfikowano u wielu Eukaryota, lecz *in vitro* wykazuje on znikomą lub całkowity brak aktywności metylotransferazy DNA [22, 42]. Delecja genu *Dnmt2* analizowana w mysich pierwotnych komórkach zarodkowych nie wpływa w widoczny sposób na metylację DNA, mimo że gen ten zawiera wszystkie katalityczne domeny charakterystyczne dla DNMT [35]. Przeciwnie u *Drosophila*: gen *Dnmt2* okazał się być istotny dla metylacji genomu w komórkach embrionalnych. Konsekwentnie

nadekspresja genu *Dnmt2* u muszki prowadzi do hipermetylacji genomu w dinukleotydach CpT i CpA [22, 42].

Gen *Dnmt3L* u ssaków wykazuje wysoką homologię do *Dnmt3*, lecz tak jak w przypadku *Dnmt2*, jego aktywność jest rozwojowo specyficzna. *Dnmt3L* ulega ekspresji jedynie podczas gametogenezy, w okresie, w którym jest ustanawiane rodzicielskie piętno genomowe. Mutacja *Dnmt3L* skutkuje utratą metylacji genów podlegających matczynemu piętnowaniu, co przejawia się ich nieprawidłową ekspresją. *Dnmt3L* wpływa także na metylację *de novo* rozproszonych sekwencji repetytywnych w premejotycznych męskich komórkach rozrodczych [9, 10]. Biochemiczne dowody wskazują, że udział *Dnmt3L* w metylacji odbywa się za pośrednictwem metylotransferaz o aktywności *de novo*: *Dnmt3a* i *Dnmt3b* [10].

3.2. Metylacja cytozyny u grzybów

Dogodnym organizmem modelowym służącym do badań zjawisk metylacji jest *Neurospora crassa*, gatunek, który ma pojedynczą metylotransferazę DIM-2 odpowiedzialną za wszelkie możliwe typy metylacji genomu *Neurospora*. Dodatkowo mutacja genu *dim-2* nie wywiera wyraźnego wpływu na fenotyp, mimo obszernej demetylacji genomu [33].

Większość genomu *Neurospora* jest pozbawiona metylacji, przyjmuje się, że ok. 1,5% wszystkich cytozyn ma dołączoną grupę metylową. Metylacja genomu dotyczy rybosomalnego DNA oraz sekwencji zmienionych na skutek punktowych mutacji RIP (ang. *repeat-induced point mutation*). Mutacje RIP są ograniczone do sekwencji repetytywnych genomu i zachodzą tylko podczas rozmnażania płciowego, gdzie dochodzi do połączenia strzępek grzybni przeciwstawnych typów koniugacyjnych, początkowo bez kariogamii. Haploidalne jądra ustawiają się parami i pozostają w takim układzie aż do kariogamii, po której następuje mejoza. Mutacje punktowe RIP zachodzą w haploidalnych jądrach w okresie pomiędzy plazmogamią a kariogamią [56].

Mechanizm RIP prowadzi do wybiórczej konwersji CpA w TpA, generując powstawanie sekwencji bogatych w T+A [56]. Jedna z hipotetycznych dróg mutacji RIP zakłada miejscowo specyficzną *de novo* metylację cytozyny, a następnie jej enzymatyczną deaminację przy 4. węglu, co prowadzi do powstania T. Druga z hipotez przyjmuje bezpośrednią deaminację cytozyny do uracylu. Jednym z pierwszych poznanych elementów maszynierii RIP jest RID (ang. *RIP defective*) prawdopodobnie czynnik o aktywności metylazy DNA lub aktywności deaminującej cytozynę [20].

Sekwencje bogate w A+T wygenerowane na skutek mutacji RIP w większości przypadków stanowią sygnał dla metylacji pozostałych cytozyn w obrębie rejonu A+T-bogatego i sekwencji flankujących. Zmiany wywołane przez RIP w składzie nukleotydowym sekwencji zmetylowanych nie są jednak rozległe i dotyczą zaledwie kilku procent nukleotydów. Próbuąc wyjaśnić mechanizm metylacji *de novo* u *Neurospora*, podjęto analizę sekwencji zmutowanych wskutek działania RIP [56]. Sekwencje z umiarkowaną zawartością TpA i ApT indukują silniej metylację od sekwencji z maksymalną ich zawartością, np. sekwencja o składzie (TAAA)_n powtórzona 25 razy wywołuje pięciokrotnie większą metylację od sekwencji o tej samej długości zbudowanej z

monomerów (TATA)_n. Sekwencja (TAAA)_n powtórzona 75 razy jest już wystarczającej długości, by wywołać silną metylację w dowolnym miejscu genomu, nawet jeśli sekwencje flankujące nie wykazują charakterystycznych zmian powstałych na skutek mutacji RIP. Badania *in vitro* ujawniły, że spośród 16 testowanych kombinacji najbardziej stymulująco na metylację *de novo* działają zestawienia sekwencji w układzie (TAAA)_n i (TTAA)_n. Siła metylacji zależy do ilości powtórzeń sekwencji bogatej w A+T. Nawet słaby sygnał, ale zwielokrotniony odpowiednią ilość razy, może wywoływać silną metylację [56]. Wprowadzenie zasad G:C w którąkolwiek pozycję w wielokrotnie powtórzonej sekwencji (TAAA)_n hamuje metylację. Efekt jest jednak różny i zależy od pozycji. Inhibicja metylacji jest szczególnie silna np. w układzie CpApT [56].

3.3. Mechanizm metylacji cytozyny u roślin

Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera co najmniej 10 genów kodujących metylotransferazy, które podzielono pomiędzy 3 rodziny, kolejno są to: MET1, CMT i DRM. Jest to do tej pory najliczniejsza grupa metylotransferaz znalezionych u pojedynczego organizmu [16, 64]. Kryterium, jakie posłużyło do pogrupowania genów na rodziny, stanowi homologia roślinnych metylotransferaz DNA z sekwencjami ssaków. Szczegółowo badana roślinna klasa metylotransferaz MET1 jest wysoce homologiczna z Dnmt1 ssaków, odpowiedzialną za metylację zachowawczą w czasie podziałów komórek. Potranskrypcyjne wyciszenie genu *MET1* poprzez degradację transkryptu genu przyczynia się do ogólnego spadku poziomu metylacji DNA o ok. 10% [17]. Większa redukcja, aż o około 50%, dotyczyła mutantów genu *Met1* (*met1-1* i *met1-2*) [32]. Wynikająca stąd funkcja genu polega na utrzymywaniu stałego poziomu metylacji genomu. Demetylacji, na skutek zahamowania aktywności MET1, w pierwszej kolejności ulegają sekwencje repetytywne, co przejawia się zaburzeniami morfogenezy i procesu kwitnienia [32, 53]. Badania te potwierdzają znaczącą rolę metylacji w regulacji ekspresji genów. Homozygotyczne zarodki z dwoma nieaktywnymi allelami genu *Met1*, uzyskane metodą homologicznej wymiany genów, są letalne na skutek całkowitej utraty metylacji w CpG i umiarkowanej w pozostałych sekwencjach [53].

Klasa roślinnych DRM (ang. *domain rearranged methyltransferase*), analogiczna do metylotransferazy Dnmt3 ssaków, prowadzi metylację *de novo* na obu niciach DNA. Koniec N-terminalny tych metylotransferaz zawiera szereg domen ubikwitynowych, które mogą brać udział w interakcjach białko-białko [11, 64].

Metylasy charakterystyczne wyłącznie dla roślin to chromometylasy (CMT – ang. *chromomethylase*) zaangażowane w metylację zachowawczą. Cechą, która je wyróżnia, jest specyficzna chromodomena zlokalizowana wewnątrz konserwatywnej katalitycznej domeny metylotransferaz DNA. CMT3 prowadzi metylację w sekwencjach innych niż CpG, a w szczególności w sekwencji CpNpG. W przeciwieństwie do mutantów genu *Met1*, mutanty genu *CMT3* lub *DRM* nie wytwarzają nieprawidłowych fenotypów, chociaż w niektórych przypadkach potwierdzono wznowienie aktywności genów wcześniej wyciszonych [4, 37].

4. METYLACJA DNA, INTERFERENCJA RNA I TRANSKRYPCYJNE WYCISZENIE GENÓW

Potranskrypcyjne wyciszenie genów (PTGS, ang. *post-transcriptional gene silencing*) jest mechanizmem redukującym poziom cytoplazmatycznego RNA, który pierwotnie został odkryty u roślin. Podobny mechanizm został zidentyfikowany u zwierząt, gdzie jest określany jako interferencja RNA (RNAi) [2]. Drugą formą wyciszania genów u roślin jest metylacja DNA za pośrednictwem RNA, którą określa się jako RdDM (ang. *RNA-directed DNA methylation*). Jest to jeden z lepiej poznanych sposobów wyznaczania miejsc metylacji DNA. Interakcje pomiędzy RNA-DNA są sygnałem do podjęcia metylacji, która decyduje o aktywności transkrypcyjnej genu. RdDM łączy się ściśle z PTGS/RNAi. O specyfice obu procesów decyduje RNA o strukturze 2-niciowej (dsRNA, ang. *double strand RNA*), który jest cięty przez RNazy klasy III na fragmenty o długości 21–26 nukleotydów [2]. W ten sposób powstają cząsteczki siRNA (ang. *small interfering RNA*) i miRNA (ang. *micro RNA*). U zwierząt miRNA i siRNA powstają w wyniku aktywności enzymatycznej tej samej RNazy III noszącej nazwę Dicer, a u roślin grupy enzymów określanych jako DCL (ang. *Dicer like*) [24].

W trakcie PTGS antysensowny siRNA po rozpleceniu do pojedynczych łańcuchów wchodzi w skład kompleksu RISC (ang. *RNA induced silencing complex*), odpowiedzialnego za degradację komplementarnego mRNA. W procesie tym wydajnie uczestniczą liczne białka rodziny ARGONAUTE (AGO), które prawdopodobnie ułatwiają wiązanie się siRNA do sekwencji docelowej RNA [12]. Endonukleolityczne cięcie mRNA w połowie rejonu komplementarnego do siRNA zapoczątkowuje degradację całego transkryptu [6, 24].

Trudno jednoznacznie ustalić, czy RdDM jest kierowana przez długie dsRNA czy siRNA. Minimalna długość sekwencji DNA podlegającej zależnej od RNA metylacji to zaledwie 30 pz, co rodzi przypuszczenia, że efektorowy RNA powstaje w wyniku enzymatycznego cięcia dsRNA [39]. RdDM wywołuje wysoki poziom metylacji większości sekwencji DNA, niezależnie od kontekstu występowania cytozyny, w obszarze, który wykazuje homologię pomiędzy dsRNA i sekwencją DNA. RdDM wymaga udziału roślinnych metylotransferaz o aktywności *de novo*: DRM i/lub CMT [45].

RdDM po raz pierwszy zaobserwowano u transgenicznym roślin tytoniu infekcyjnym wiroidem. Rośliny te miały wielokrotne kopie cDNA wiroidu zintegrowane z genomem [66]. Metylacja DNA ograniczona była wyłącznie do obszarów cDNA wiroidu i zachodziła równolegle z autonomiczną replikacją wiroidu [45, 66]. Wynik ten, jak i kolejne badania dotyczące kilku różnych wirusów roślinnych potwierdziły, że podczas infekcji komórek dochodzi do metylacji DNA w obszarze zgodnym z RNA wirusa [30, 65]. Ponieważ wiroidy i wirusy podczas swego cyklu litycznego wytwarzały tylko RNA, testy te bezspornie udowodniły, że RNA może bezpośrednio kierować metylacją komplementarnej sekwencji DNA.

Mechanizm RdDM może być nie tylko wywoływany przez infekcje wirusowe, ale również przez transgenizację roślin. Bardzo często ekspresja transgenu jest niższa od oczekiwanej, do czego przyczynia się między innymi inaktywacja genu na skutek

metylacji jego sekwencji. Potwierdzono to eksperymentalnie na transgenicznym roślina *A. thaliana* z dodatkowym odwróconym fragmentem sekwencji genu β -glukuronidazy (*GUS*), który ulegał ekspresji równolegle z endogennym *GUS*. Sensowne i antysensowne transkrypty łączyły się ze sobą tworząc strukturę 2-niciową. W transgenicznej roślinie spadała znacząco ilość *GUS*, a sekwencja genu ulegała metylacji [7].

Metylacja DNA ustanowiona w drodze RdDM nie jest stała i zależy od długości sekwencji DNA i otoczenia, w jakim występuje cytozyna. Zanik sygnałów dla RdDM prowadzi do obniżenia poziomu metylacji większości dinukleotydów CpG [31] lub do całkowitej utraty metylacji [37]. W przypadku wielu transgenów zdolnych do wywołania RNAi i metylacji DNA nie dochodzi do wyciszenia transkrypcji wprowadzonego genu. Metylacja zazwyczaj dotyczy wyłącznie sekwencji kodującej genu i nie rozprzestrzenia się na sekwencję promotora, który zachowuje aktywność transkrypcyjną [14].

Funkcjonalne znaczenie RdDM może wydawać się mało przejrzyste, jednak w przypadku metylacji sekwencji promotora dochodzi do transkrypcyjnego wyciszenia genów. Jako przykład można podać wyciszenie ekspresji genu *GFP* (ang. *Green Fluorescent Protein*) znajdującego się pod kontrolą sekwencji promotora 35S w transgenicznej roślinie tytoniu. Infekcja takiej rośliny modyfikowanym wirusowym RNA niosącym sekwencję *GFP* pod promotorem 35S hamuje radykalnie ilości wytwarzanego białka *GFP* na skutek metylacji sekwencji promotora i wyłączenia aktywności transgeny. W tym układzie transkrypt *GFP*, jak i wirusowy RNA były degradowane [30, 60]. Nie wszystkie sekwencje DNA są jednakowo podatne na RdDM. W pewnych szczególnych przypadkach infekcja roślin tytoniu wirusowym RNA niosącym kopie genów gospodarza wywołuje wyłącznie PTGS bez metylacji sekwencji DNA [30]. Może to odzwierciedlać wyjątkowe cechy niektórych endogennych genów, które są chronione przed RdDM lub znacząco opóźniają ten proces w czasie infekcji wirusowej.

4.1. Drogi generowania sygnałów dsRNA odpowiadających za metylację DNA

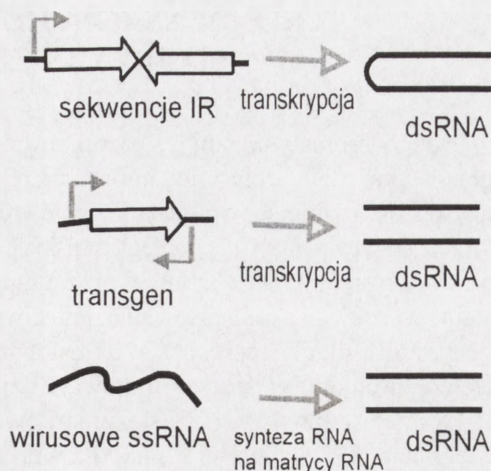
Warunkiem zajścia metylacji drogą RdDM jest powstanie w komórce struktur dsRNA. U roślin dsRNA powstaje między innymi na skutek infekcji wirusowych cząsteczek RNA lub przez wprowadzenie transgenów zawierających sekwencje powtórzone o przeciwnej orientacji IR (ang. *inverted repeats*). Sekwencje IR mają samoistną zdolność do wytwarzania struktury dsRNA typu spinki do włosów, która jest rozpoznawana przez rybonukleazy Dicer generujące powstawanie siRNA [40]. Brak sekwencji IR w transgenie nie wyklucza jednak możliwości występowania w komórce jego formy dwuniciowej. Pojedyncze nici RNA (ssRNA, ang. *single strand RNA*) transgeny mogą służyć jako matryca podczas syntezy nici antyrównoległych (ryc. 2). Enzymy, które katalizują ten proces, należą do klasy polimeraz RNA zależnych od RNA (RdRP, ang. *RNA-dependent RNA polymerase*) [41, 57]. siRNA hybrydując do transkryptu zwiększa ilość powstających cząsteczek dsRNA bezpośrednio – służąc jako starter dla RdRP lub pośrednio – zwiększając dostępność transkryptu dla polimerazy RdRP. siRNA pierwotnie komplementarne wyłącznie do końca 5' docelowego transkryptu często rozprzestrzenia się na całą długość docelowego transkryptu i w takim wypadku metylacji DNA podlega cała sekwencja transgeny [30, 60]. Możliwe, że antysensowny siRNA oddziałuje ze swoim transkrypcyjnym generując powstanie

dsRNA, co może zmieniać strukturę RNA i/lub kompleksu rybonukleoprotein rekrutując RdRP do końca 3'. Druga z możliwości zakłada, że kompleks dsRNP/siRNP wpływa bezpośrednio na DNA i jego strukturę.

Poszukując czynników odpowiedzialnych za biogenezę dsRNA u *Arabidopsis* wyizolowano 6 potencjalnych RdRP [41] oraz 10 białek typu ARGONAUTE i 4 białka należące do rodziny roślinnych nukleaz pochodnych enzymu Dicer (DCL) [40]. Spośród 6 RdRP tylko 3 (RDR1, RDR2 i RDR6) wykazują aktywność. Dokładna analiza czynników biorących udział w obróbce dsRNA wskazuje na ich działanie w kilku równolegle przebiegających procesach, czasami

zachodzących na siebie funkcjonalnie, co zależy prawdopodobnie od lokalizacji i struktury RNA. Przykładowo RDR6 i białko AGO1 są czynnikami koniecznymi w przypadku PTGS transgenów pozbawionych sekwencji IR, które nie tworzą samoistnie struktur dsRNA [7, 41], a jednocześnie bardzo podobne funkcje spełnia RDR2 i AGO4, które są wymagane do nagromadzenia siRNA dla określonych endogennych sekwencji [50]. Odpowiednio, każdy z wymienionych czynników jest konieczny do podtrzymywania metylacji DNA sekwencji innych niż CpG, które mają swój odpowiednik w sekwencji RNA. Wyjaśnia to częściowo związek między dsRNA i RdDM.

Roślinne DCL kontrolują różnorodne procesy. DCL1 *Arabidopsis thaliana* jest niezbędny do obróbki miRNA, które w odróżnieniu od siRNA są jednoniciowe. DCL2 uczestniczy w obronie antywirusowej rośliny. Utrata aktywności genu *dcl2* wiąże się z obniżonym poziomem wirusowych siRNA, a także podwyższoną wrażliwością na infekcje wirusowe, co zaobserwowano u roślin infekowanych TVC (ang. *turnip crinkle virus*). DCL3 i RDR2 generują powstawanie endogennej siRNA przeważnie o wielkości ok. 24 pz. Utrata endogennej siRNA u podwójnych mutantów *dcl3* i *rdr2* *A. thaliana* była zasocjowana z utratą metylacji heterochromatyny i zwiększoną transkrypcją określonych loci [68]. DCL3 i RDR2 są konieczne dla ustanowienia i podtrzymania wzoru metylacji sekwencji DNA wyznaczonych w procesie RdDM [68]. Mutacje znanych genów *DCL* nie wpływają na PTGS transgenów ani na metylacyjne wyciszenie promotorów, co wskazuje na obfite powstawanie siRNA przy udziale dodatkowych DCL lub też w określonych przypadkach RdDM jest wywoływany przez dłuższe dsRNA [40].



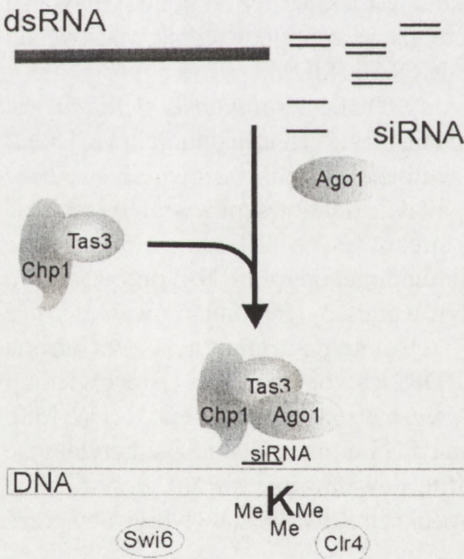
RYCINA 2. Mechanizm powstawania dsRNA (wg [40] – zmodyfikowany)

5. KONDENSACJA HETEROCHROMATYNY PRZY UDZIALE siRNA

Heterochromatyna stabilizuje strukturę chromosomów, wpływa na regulację ekspresji genów i koniugację chromosomów oraz rekombinację genów, poprzez oddziaływanie na częstość i umiejscowienie chiazm. Wyróżnia się heterochromatynę konstytutywną, która zazwyczaj nigdy nie podlega transkrypcji, jest zdeterminowana molekularnie dzięki obecności satelitarnego DNA, reprezentuje regiony genomu, które są permanentnie w stanie wysokiego skondensowania. Przeciwnie heterochromatyna fakultatywna zawiera geny, które uległy represji i w określonych warunkach mogą być transkrybowane. Heterochromatyna jest zdeterminowana dzięki wysokiemu stopniowi metylacji histonu H3 w miejscu lizyny 9 (H3K9) i umiarkowanemu poziomowi metylacji lizyny 4 (K4). Metylacja H3K9 stanowi sygnał dla wiązania się czynnika HP1, który jest białkiem charakterystycznym dla heterochromatyny [3].

Wyjątkowość konstytutywnej heterochromatyny centromerowej polega na zamianie histonu H3 na białko: CENP-A (*H. sapiens*), Cid (*Drosophila*), HTR12 (*Arabidopsis*), HCP-4 (*C. elegans*) i Cse4p (*S. pombe*). Wszystkie te białka są zaliczane do rodziny CenH3 (ang. *centromere-specific H3-like*) [62]. Są one niezbędne dla zasadniczych funkcji centromeru, segregacji chromosomów w czasie podziałów komórkowych, gdyż stanowią one jeden z głównych elementów wewnętrznej, granularnej warstwy kinetochoru przylegającej do chromatyny [59].

Za kondensację chromatyny w rejonie centromeru u *Schizosaccharomyces pombe*



RYCINA 3. Schemat kontrolowanej przez siRNA metylacji lizyny 9 histonu H3 prowadzącej do kondensacji chromatyny (wg [48] – zmodyfikowany)

odpowiada siRNA. Mechanizm jego powstawania jest taki sam jak w przypadku interferencji RNA. U *S. pombe* i *Arabidopsis* występuje duża pula endogennego siRNA komplementarna do repetytywnych sekwencji centromerowych, transpozonów i innych retroelementów [38, 50]. Czynniki powiązane z interferencją RNA, takie jak: Dicer, RdRP i AGO, są konieczne dla podtrzymania centromerowych sekwencji satelitarnych w stanie wysokiej kondensacji heterochromatyny, co zostało udowodnione w przypadku chromosomów *S. pombe*. Mutanty, które utraciły niektóre z elementów maszyny odpowiedzialnej za PTGS, tracą metylację histonów H3 w pozycji K9, która jest uważana za modyfikację specyficzną dla heterochromatyny [23]. Podobny efekt wywołują mutacje w genach kodujących Swi6 (ssaczy homolog HP1) i Clr4 (homolog ssaczej metylotrans-

ferazy histonowej Suv39) metylującej lizynę K9 histonu H3 [62]. Formowanie heterochromatyny przy udziale siRNA nie jest jednak uniwersalne dla wszystkich organizmów. *Neurospora* dla wytworzenia i podtrzymywania wysokiej kondensacji heterochromatyny nie wymaga kluczowych elementów odpowiedzialnych za proces interferencji RNA [18].

Niskocząsteczkowe siRNA inicjuje kondensację chromatyny poprzez kompleks RITS (ang. *RNA-induced transcriptional silencing complex*), który zapoczątkowuje modyfikacje struktury chromatyny i wyłączenie aktywności obszarów przeznaczonych do kondensacji w komórkach *Schizosaccharomyces*. W skład kompleksu RITS wchodzi: Ago1 – białko z rodziny ARGONAUTE zaangażowane w proces RNAi, a także białko Chp1 (ang. *heterochromatin-associated chromodomain protein 1*) i Tas3 (ang. *targeting complex subunit 3*). Powstanie puli endogennego siRNA komplementarnego do sekwencji centromerowych wymaga wcześniejszego wytworzenia struktur dsRNA, co zapewnia transkrypcja obszarów repetytywnych centromeru z dwóch opozycyjnie zorientowanych promotorów [63]. Ponieważ centromer *S. pombe* jest regionem o znacznej wielkości od 40 do 100 kb, zbudowanym z powtarzalnych sekwencji, trudno jednoznacznie określić, czy powstający siRNA jest wynikiem aktywności domeny pojedynczego centromeru, czy może różnych centromerów [50]. Przypuszcza się również, że do produkcji dodatkowych kopii dsRNA wykorzystywana jest klasa polimeraz RdRP prowadząca transkrypcję na matrycy ssRNA [29, 61]. Potencjalne miejsca kondensacji chromatyny wyznacza siRNA poprzez swoją homologię do sekwencji docelowej, którą może być zarówno DNA, jak i powstający transkrypt siRNA, działając jako wysoko selektywny czynnik. Prawdopodobnie siRNA i DNA lub siRNA i jego powstający transkrypt wchodzi we wzajemne interakcje za pośrednictwem białka Ago1, co prowadzi do naboru pozostałych elementów kompleksu RITS: Chp1 i Tas3 (ryc. 3). Proces heterochromatynizacji, w przylegającym rejonie chromatyny wyznaczonym przez RITS, rozpoczyna się od przyłączenia metylotransferazy Clr4, która metyluje histon H3 w miejscu lizyny 9, co wywołuje przyłączenie się Swi6 i całą kaskadę zdarzeń prowadzącą do kondensacji obszaru centromeru (tab. 1). Czynniki Chp1 i Tas3 mogą być również lokalizowane w heterochromatynie poza obszarami centromeru, niezależnie od Ago1 i siRNA [48].

TABELA 1. Występowanie elementów wybranych mechanizmów wywołujących wyciszenie transkrypcji u różnych gatunków

Organizm	Metylotransferaza K9 histonu H3	HP1	Metylowana cytozyna	Autorzy
<i>S. pombe</i>	Clr4	Swi6	nie	[48, 61, 63]
<i>N. crassa</i>	DIM-5	?	tak	[18, 55]
<i>M. musculus</i>	Suv39h1, Suv39h2	MHP1a, M31/MOD1, M32/MOD2	tak	[34, 52]
<i>H. sapiens</i>	SUV39H1	HP1	tak	[34, 52]
<i>A. thaliana</i>	KRYPTONITE	LHP1	tak	[27]

6. ZWIĄZEK MIĘDZY METYLACJĄ DNA A STRUKTURĄ CHROMATYNY

Uważa się, że metylacja DNA może być wywoływana przez zmienną strukturę chromatyny [8]. Histony rdzeniowe są podatne na szeroki wachlarz potranslacyjnych modyfikacji obejmujących: acetylację, fosforylację, metylację, ubikwitynację, glikozylację i ADP-rybozylację. Modyfikacje dotyczą zwłaszcza N-końców histonów dostępnych dla interakcji z innymi histonami i niehistonowymi białkami chromosomowymi. Modyfikacje histonów są częścią złożonego systemu. Odmienne modyfikacje jednego lub więcej histonów albo kombinacje tych zmian tworzą rodzaj kodu histonowego, który decyduje o rodzaju nukleosomowych interakcji i o asocjacji niehistonowych białek chromatynowych. Wymienione modyfikacje bezpośrednio przekładają się na stopień kondensacji chromatyny i regulację aktywności genów [51, 52]. Wiele z tych modyfikacji może być także zależnych od siebie. Dla przykładu kombinacja acetylowanych histonów H4 przy lizynie 8, H3 przy lizynie 14 i fosforylacja seryny 10 histonu H3 jest często pozytywnie skorelowana z transkrypcją. Natomiast trimetylacja lizyny 9 histonu H3 i brak acetylacji histonów H3 i H4 wiążą się z represją transkrypcji, a taki rodzaj modyfikacji jest konieczny do kondensacji chromatyny u myszy. Zmianom struktury chromatyny związanym z pozycjonowaniem histonów w czasie replikacji DNA towarzyszy deacetylacja lizyny 4 i 12 histonu H4, a kondensacji chromosomów metafazowych – fosforylacja H2A i H3 [46, 47].

Aktywność transkrypcyjną chromatyny warunkują enzymy modyfikujące histony: acetylaza HAT, deacetylaza HDAC, metylotransferazy HMT, demetylaza, kinazy i fosfatazy histonowe. Metylacja histonów przy udziale HMT jest już znana od dawna. Na N-końcach histonów H3 i H4 istnieje co najmniej 5 miejsc metylacji lizyny. Typowy ssaczy histon H3 jest metylowany w miejscu lizyny K9 i K27, a histon H4 – w K20. Lizyna może posiadać dołączone trzy, dwie lub jedną grupę metylową. Sposób demetylacji histonów przez długi okres stanowił zagadkę, choć wiadomo było, że histony H2B, H3 i H4 podlegają odwracalnej metylacji [47].

Metylacja histonów jest termodynamicznie bardzo stabilną modyfikacją, dlatego tym ciekawsze wydaje się odkrycie enzymu usuwającego dołączone grupy metylowe [54]. Pierwsza odkryta demetylaza o nazwie LSD1 (ang. *lysine-specific demethylase 1*) usuwa grupy metylowe lizyny 4 w histonie H3. Reakcja jest katalizowana na mono- i dimetylowanej lizynie z wyłączeniem trimetylowanej lizyny. Enzym nie zrywa bezpośrednio wiązania N-CH₃, lecz prawdopodobnie indukuje oksydację lizyny 4 w histonie H3. W wyniku tej reakcji powstaje lizyna wolna od metylacji oraz formaldehyd. Właściwości demetylazy LSD1 wynikają z jej wysokiej homologii do aminooksydaz zależnych od FAD (przenośnika elektronów w reakcjach utleniania). Cechą, która wyróżnia LSD1, jest sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) oraz domena SWIRM charakterystyczna dla białek chromatynowych. Wyciszenie genu *LSD1* prowadzi do wzrostu metylacji lizyny 4 H3, co ma bezpośrednie przełożenie na poziom transkrypcji [54].

Mutacje histonu H3 w miejscu K9, poprzez podstawienie lizyny innym aminokwasem, skutkowały utratą metylacji DNA u *N. crassa*, dostarczając pierwszego dowodu na to, że metylacja histonów jest powiązana z metylacją DNA. Metylacja histonów u *Neurospora* [55] i *Arabidopsis* [27], zwłaszcza metylacja histonu H3 w pozycji K9, wywołuje metylację cytozyny w DNA (tab. 1). Nie wiadomo, czy podobny mechanizm działa u kręgowców. Z kolei metylacja DNA może wywoływać metylację histonów. U ssaków pośredniczy w tym białko MeCP2 wiążące metylowane CpG, gromadzi ono w tych miejscach deacetylazy histonów, a po nich przyłączają się kolejno HMT [21]. Modyfikowane histony są rozpoznawane przez różne mechanizmy. Jednym z białek rozpoznających metylację H3K9 jest HP1 (ang. *heterochromatin-associated protein 1*) zawierające dwie wysoce konserwatywne domeny: CD (ang. *chromo domain*) i CSD (ang. *chromo shadow domain*) [36]. Domena CD wykazuje wysoką specyficzność wiązania do N-końca H3 posiadającego zmetylowaną lizynę K9 [28], a rolą CSD jest oddziaływanie z białkami niehistonowymi. Lokalizacja HP1 u ssaków jest uzależniona od obecności metylowanej lizyny 9 w histonie H3 i wiele wskazuje na to, że HP1 organizuje strukturę heterochromatyny [3]. U myszy pericentromerowa chromatyna charakteryzuje się wysokim poziomem metylacji DNA i trimetylacją histonu H3 w pozycji K9 [45]. Za ustanowienie trimetylacji histonu H3 odpowiadają metylotransferazy Suv 39h1 i Suv 39h2 (tab. 1). Modyfikacja H3K9 przez HMT tworzy miejsca wiązania dla białka HP1, które z kolei oddziałuje z metylotransferazami DNA: Dnmt1 i/lub Dnmt3a/Dnmt3b prowadząc do metylacji DNA [34]. Nie można jednak wykluczyć istnienia innych potencjalnych dróg metylacji *de novo*.

7. METYLOWANE REGIONY DNA I ICH WZAJEMNE ZALEŻNOŚCI PODCZAS PIĘTNOWANIA RODZICIELSKIEGO

Geny podlegające piętnowaniu genomowemu są transkrybowane wyłącznie mono-allelicznie. Do tej grupy genów zalicza się *Igf2r*. Wykazuje on odmienne piętnowanie w zależności od pochodzenia od jednego z rodziców. W rejonach podlegających piętnowaniu rodzicielskiemu metylacji ulegają zróżnicowane sekwencje i w pewnych przypadkach bezdyskusyjnie one same stanowią sygnał dla metylacji. Gen *Igf2r* zawiera dwie wyspy CpG nazywane regionami 1 i 2. Gen niesie informacje o receptorze dla insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF2 (ang. *insulin-like growth factor type 2*), odgrywającym istotną rolę w rozwoju płodu ssaków. Region 2 leży w obrębie intronu i jest zmetylowany w aktywnym matczynym chromosomie. Region 1, który otacza miejsce startu transkrypcji *Igf2r* jest zmetylowany w wyciszonym chromosomie ojcowskim. Po usunięciu z transgeny regionu 2, region 1 nie podlegał metylacji podczas dziedziczenia ojcowskiego i w rezultacie ojcowska wersja transgeny była aktywna. Można więc sądzić, że niezmetylowany region 2 jest niezbędny do metylacji regionu 1 i wyciszenia aktywności genu, natomiast piętnowany matcznie region 2 lub jego delecja blokują lub powodują niezdolność do metylacji regionu 1 [67].

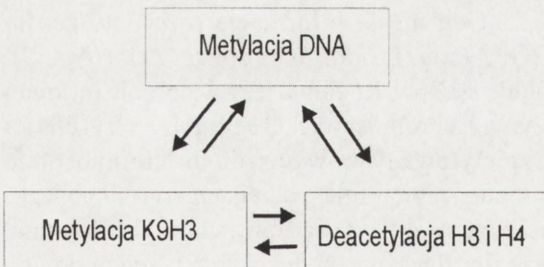
8. UDZIAŁ CZYNNIKÓW REMODULUJĄCYCH CHROMATYNĘ W METYLACJI DNA

Lsh (ang. *lymphoid specific helicase*) należy do rodziny SNF2, czynników remodelujących chromatinę, które zmieniają istniejące oddziaływania na poziomie DNA-histony, co umożliwia przesuwanie się nukleosomów względem DNA. Przekształcanie struktury chromatyny zmienia jej dostępność dla potencjalnych czynników transkrypcyjnych. Metylacja wysp CpG i modyfikacje histonów są konieczne do kondensacji chromatyny. Czynniki Lsh wykazuje preferencyjną asocjację z chromatiną przycentromerową, gdzie uczestniczy w metylacji sekwencji CpG. Delecja genu *Lsh* u myszy skutkuje akumulacją di- i trimetylowanej lizyny 4 w H3, natomiast nie powoduje zmian metylacji lizyny 9 histonu H3 jak i rozmieszczenia czynnika HP1. Podobny wzrost ilości metylowanej lizyny 4 w H3 następuje w przypadku traktowania komórek 5-azacytydyną (lub podawanie analogu tego związku zwierzętom), która powoduje demetylację genomu [71].

Gen *Lsh* jest bardzo aktywny w czasie embriogenezy, a delecja tego genu prowadzi do letalności okołoporodowej myszy [25, 70]. Efekt delecji *Lsh* wiąże się z wzrostem acetylacji histonów w obrębie sekwencji repetytywnych wchodzących w skład chromatyny przycentromerowej i reaktywacją ich aktywności transkrypcyjnej [25, 70]. Zniszczenie struktury heterochromatyny, przez długoterminowe działanie inhibitorem acetylacji histonów (trichostatyna A), wstrzymuje asocjację Lsh z przycentromerową chromatiną [70]. Można domniemywać, że Lsh wiąże się selektywnie wyłącznie z sekwencjami repetytywnymi [25].

Mutacje w genie *DDM1 A. thaliana* kodującym czynnikiem remodelującym chromatinę, będący odpowiednikiem ssaczego Lsh, prowadzą również do znacznego obniżenia poziomu metylacji cytozyny. Czynniki DDM1 działa jako regulator dostępności DNA i histonów dla wszelkiego typu modyfikacji [2].

9. DEACETYLACJA HISTONÓW POWODUJE METYLACJĘ DNA



RYCINA 4. Układ sprzężeń łączący trzy główne mechanizmy wyciszenia genów (wg [52] – zmodyfikowany)

Na ekspresję rybosomalnego DNA w jąderku u *Arabidopsis* wywierają wpływ deacetylazy histonów, takie jak HDT1 i HDA6 [19]. Enzymom tym przypisuje się wiele interakcji ze składnikami maszyny metylującej DNA. Są one powiązane z metylazami histonów i metylacją DNA i działają w układzie sprzężeń zwrotnych. Metylacja lizyny 9 histonu H3 powoduje deacetylację histonów i metylację cytozyny w DNA, deace-

tylacja histonów powoduje metylację DNA i metylację lizyny 9 H3, a metylacja DNA pociąga za sobą deacetylację histonów i metylację lizyny 9 histonu H3 (ryc. 4) [52].

10. PODSUMOWANIE

Związek metylacji DNA i modyfikacji histonów nie jest do końca poznany. Metylotransferazy DNA są jedynie częścią sprzężenia, które łączy modyfikacje DNA i modyfikacje chromatyny. W tym układzie istotne miejsce zajmują czynniki mogące modyfikować strukturę chromatyny wiążąc się do metylowanego DNA [21]. Na podstawie zgromadzonej wiedzy możemy rozważać kilka możliwych szlaków, w których różne struktury chromatyny wywołują kolejne następstwa i interakcje między czynnikami remodelującymi chromatynę, modyfikującymi histony, czy czynnikami pośredniczącymi w przekazywaniu sygnałów (np. HP1) i wreszcie metylującymi cytozynę w DNA (ryc. 4).

LITERATURA

- [1] ATTWOOD JT, YUNG RL, RICHARDSON BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**: 241–257.
- [2] AUFSATZ W, METTE MF, VAN DER WINDEN J, MATZKE AJ, MATZKE M. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16499–16506.
- [3] BANISTER AJ, ZEGERMAN P, PARTRIDGE JF, MISKA EA, THOMAS JO, ALLSHIRE RC, KOUZARIDES T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 2001; **410**: 120–124.
- [4] BARTEE L, MALAGNAC F, BENDER J. *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev* 2001; **15**: 1753–1758.
- [5] BAYLIN SB, HERMAN JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; **16**: 168–174.
- [6] BAŃ D. RNAi – interferencja RNA – skuteczny sposób na ciszę. *Post Biochem* 2003; **49**: 136–146.
- [7] BÉCLIN C, BOUTET S, WATERHOUSE P, VAUCHERET H. A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol* 2002; **12**: 684–688.
- [8] BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; **16**: 6–21.
- [9] BOURC'HIS D, BESTOR TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 2004; **431**: 96–99.
- [10] BOURC'HIS D, XU GL, LIN CS, BOLLMAN B, BESTOR TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001; **294**: 2536–2539.
- [11] CAO X, SPRINGER NM, MUSZYNSKI MG, PHILLIPS RL, KAEPLER S, JACOBSEN SE. Conserved plant genes with similarity to mammalian *de novo* DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4979–4984.
- [12] CARMELL MA, XUAN Z, ZHANG MQ, HANNON GJ. The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 2002; **16**: 2733–2742.
- [13] COSTELLO JF, PLASS C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; **38**: 285–303.
- [14] DALMAY T, HAMILTON A, RUDD S, ANGELL S, BAULCOMBE DC. An RNA dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000; **101**: 543–553.
- [15] FATAMI M, HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 4981–4984.

- [16] FINNEGAN EJ, KOVAC KA. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 189–201.
- [17] FINNEGAN EJ, PEACOCK WJ, DENNIS ES. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8449–8454.
- [18] FREITAG M, LEE DW, KOTHE GO, PRATT RJ, ARAMAYO R, SELKER EU. DNA methylation is independent of RNA interference in *Neurospora*. *Science* 2004; **304**: 1939.
- [19] FREITAG M, SELKER EU. Controlling DNA methylation: many roads to one modification. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**: 1–9.
- [20] FREITAG M, WILLIAMS RL, KOTHE GO, SELKER EU. A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8802–8807.
- [21] FUKS F, HURD PJ, WOLF D, NAN X, BIRD AP, KOUZARIDES T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 4035–4040.
- [22] GOLL MG, BESTOR TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; **74**: 481–514.
- [23] HALL IM, NOMA K, GREWAL SI. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 193–198.
- [24] HAMILTON AJ, VOINNET O, CHAPPELL L, BAULCOMBE D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 2002; **21**: 4671–4679.
- [25] HUANG J, FAN T, YAN Q, ZHU H, FOX S, ISSAQ HJ, BEST L, GANGI L, MUNROE D, MUEGGE K. Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 5019–5028.
- [26] IRA G. Wyspy CpG – jedyne niezmytylowane odcinki DNA charakterystyczne dla promotorów genów kręgowców. *Post Biochem* 1997; **43**: 189–198.
- [27] JACKSON JP, LINDROTH AM, CAO X, JACOBSEN SE. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 2002; **416**: 556–560.
- [28] JACOBS SA, TAVERNA SD, ZHANG Y, BRIGGS SD, LI J, EISENBERG JC, ALLIS CD, KHORASANI-ZADEH S. Specificity of the HPI chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J* 2001; **20**: 5232–5241.
- [29] JIA S, NOMA K, GREWAL SI. RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. *Science* 2004; **304**: 1971–1976.
- [30] JONES L, HAMILTON AJ, VOINNET O, THOMAS CL, MAULE AJ, BAULCOMBE DC. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 1999; **11**: 2291–2301.
- [31] JONES L, RATCLIFF F, BAULCOMBE DC. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 2001; **11**: 747–757.
- [32] KANKEL MW, RAMSEY DE, STOKES TL, FLOWERS S K, HAAG JR, JEDDELOH JA, RIDDLE NC, VERBSKY ML, RICHARDS EJ. *Arabidopsis MET1* cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 2003; **163**: 1109–1122.
- [33] KOUZMINOVA E, SELKER EU. *dim-2* encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *EMBO J* 2001; **20**: 4309–4323.
- [34] LEHNERTZ B, UEDA Y, DERIJCK AA, BRAUNSCHWEIG U, PETERZ-BURGOS L, KUBICEK S, CHEN T, LI E, JENUWEIN T, PETERS AH. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 2003; **13**: 1192–1200.
- [35] LEI H, OH SP, OKANO M, JUTTERMANN R, GOSS KA, JAENISCH R, LI E. *De novo* DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 1996; **122**: 3195–3205.
- [36] LI Y, KIRSCHMANN DA, WALLRATH LL. Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **4**: 16462–16469.
- [37] LINDROTH AM, CAO X, JACKSON JP, ZILBERMAN D, McCALLUM CM, HENIKOFF S, JACOBSON SE. Requirement of CHROMOMETHYLASE 3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 2001; **292**: 2077–2080.
- [38] LLAVE C, KASSCHAU KD, RECTOR MA, CARRINGTON JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 2002; **14**: 1605–1619.
- [39] MALLORY AC, REINHART BJ, BARTEL D, VANCE VB, BOWMAN LH. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15228–15233.
- [40] MATHIEU O, BENDER J. RNA-direct DNA methylation. *J Cell Sci* 2004; **117**: 4881–4888.

- [41] MOURRAIN P, BÉCLIN C, ELMAYAN T, FEUERBACH F, GODON C, MOREL JB, JOUETTE D, LACOMBE AM, NIKIS S, PICAULT N, REMOUE K, SANIAL M, Vo TA, VAUCHERT H. *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000; **101**: 533–542.
- [42] OKANO M, XIE S, LI E. Dnm2 is not required for *de novo* and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 2536–2540.
- [43] OLSZEWSKA MJ. Podstawy cytogenetyki roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 1999.
- [44] OLSZEWSKA MJ. Zmiany metylacji cytozyny podczas różnicowania komórek u roślin. *Post Biol Kom* 1999; **26** Supl.13: 83–93.
- [45] PÉLISSIER T, THALMEIR S, KEMPE D, SÄNGER HL, WASSENGGER M. Heavy *de novo* methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 1625–1634.
- [46] PETERS AH, MERMOUD JE, O'CARROLL D, PAGANI M, SCHWEIZER D, BROCKDORFF N, JENUWEIN T. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet* 2002; **30**: 77–80.
- [47] PETERSON CL, LANIEL M-A. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; **14**: 546–551.
- [48] PETRIE VJ, WUITSCHICK JD, GIVENS CD, KOSINSKI AM, PARTRIDGE JF. RNA Interference (RNAi)-dependent and RNAi-independent association of the Chp1 chromodomain protein with distinct heterochromatic loci in fission yeast. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 2331–2346.
- [49] REIK W, DEAN W, WALTER J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; **293**: 1089–1093.
- [50] REINHART BJ, BARTEL DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 2002; **297**: 1831.
- [51] RICE JC, ALLIS CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insight into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 263–273.
- [52] RICHARDS EJ, ELGIN CR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: runding up the usual suspects. *Cell* 2002; **108**: 489–500.
- [53] SAZE H, SCHEID OM, PASZKOWSKI J. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* 2003; **34**: 65–69.
- [54] SHI Y, LAN F, MATSON C, MULLIGAN P, WHETSTINE JR, COLE PA, CASERO RA, SHI Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004; **119**: 941–953.
- [55] TAMARU H, SELKER EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001; **414**: 277–283.
- [56] TAMARU H, SELKER EU. Synthesis of signals for *de novo* DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2379–2394.
- [57] TANG G, REINHART BJ, BARTEL DP, ZAMORE PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 2003; **17**: 49–63.
- [58] TARIQ M, PASZKOWSKI J. DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet* 2004; **20**: 244–251.
- [59] VAFA O, SULLIVAN KF. Chromatin containing CENP-A and α -satellite DNA is a major component of the inner kinetochore plate. *Curr Biol* 1997; **7**: 897–900.
- [60] VAISTIJ FE, JONES L, BAULCOMBE DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 2002; **14**: 857–867.
- [61] VERDEL A, JIA S, GERBER S, SUGIYAMA T, GYGI S, GREWAL SI, MOAZED D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 2004; **303**: 672–676.
- [62] VERMAAK D, HAYDEN HS, HENIKOFF S. Centromere targeting element within the histone fold domain of Cid. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 7553–75561.
- [63] VOLPE TA, KIDNER C, HALL IM, TENG G, GREWAL SI, MARTIENSSEN RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002; **297**: 1833–1837.
- [64] WADA Y. Physiological function of plant DNA methyltransferases. *Plant Biotech* 2005; **22**: 71–80.
- [65] WANG MB, WESEY SV, FINNEGAN EJ, SMITH NA, WATERHOUSE PM. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA* 2001; **7**: 16–28.
- [66] WASSENGGER M, HEIMES S, RIEDEL L, SÄNGER HL. RNA directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994; **76**: 567–576.

- [67] WUTZ A, SMARZKA OW, SCHWEIFER N, SCHELLANDER K, WAGNER EF, BARLOW DP. Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997; **389**: 745–749.
- [68] XIE Z, JOHANSEN LK, GUSTAFSON AM, KASSCHAU KD, LELLIS AD, ZILBERMAN D, JACOBSEN SE, CARRINGTON JC. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2004; **2**: 0642–0652.
- [69] YAN PS, PERRY MR, LAUX DE, ASARE AL, CALDWELL CW, HUANG TH. CpG island arrays: an application towards deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1432–1438.
- [70] YAN Q, CHO E, LOCKETT S, MUEGGE K. Association of Lsh, a regulator of DNA methylation, with pericentromeric heterochromatin is dependent on intact heterochromatin. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 8416–8428.
- [71] YAN Q, HUANG J, FAN T, ZHU H, MUEGGE K. Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation *EMBO J* 2003; **22**: 5154–5162.
- [72] YODER JA, SOMAN NS, VERDINE GL, BESTOR TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 1997; **18**: 385–395.
- [73] YODER JA, WALSH CP, BESTOR TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; **13**: 335–340.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 04.10.2005 r.

Przyjęto: 20.10.2005 r.

Gagarina 9, 87 100 Toruń,

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

UDZIAŁ BIAŁEK STRESOWYCH W ADAPTACJI WYSIŁKOWEJ*

STRESS PROTEINS IN EXERCISE ADAPTATION

Zbigniew JETHON¹, Eugenia MURAWSKA-CIAŁOWICZ¹, Piotr DZIĘGIEL²,
Marzena PODHORSKA-OKOŁÓW²

¹Zakład Fizjologii, Akademia Wychowania Fizycznego,

²Katedra Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie: Uszkodzenie białek wewnątrzkomórkowych lub zakłócenie ich syntezy prowadzi do zaburzeń homeostazy i może spowodować śmierć komórki. Przeciwdziałając tym zmianom komórka indukuje m.in. syntezę białek stresowych. Wyсіłek fizyczny, zwłaszcza długotrwały i intensywny, ma cechy oddziaływania stresowego. Można więc przypuszczać, że spowoduje to nasilenie ekspresji białek stresowych, co zostało doświadczalnie potwierdzone. Nie jest jednak w pełni zrozumiałe znaczenie tej reakcji z uwagi na różnorodne funkcje, jakie białka stresowe spełniają w organizmie. Białka stresowe (HSP – *heat shock proteins*) przejawiają w większości funkcję enzymatyczną, umożliwiającą bezpośrednią ochronę przed ujemnymi skutkami stresu. Biorąc pod uwagę masę cząsteczkową wyróżnia się dwie główne grupy HSP. Grupę białek niskocząsteczkowych i wysokocząsteczkowych. Pierwsza grupa wykazuje głównie działania osłonowe oraz ułatwia degradację uszkodzonych białek. Niektóre z nich, jak HSP27 i HSP40, podnoszą dodatkowo potencjał ochronny innych białek stresowych. Wśród wysokocząsteczkowych HSP wyróżnia się HSP60, HSP70, HSP90. Najbardziej poznana i wydaje się najbardziej istotną u człowieka jest grupa HSP70. Uczestniczy ona w zapobieganiu agregacji białek, rozwijaniu białek uszkodzonych i nienatywnych oraz w ich usuwaniu, osłonie polipeptydów tworzących się wzdłuż rybosomów i w mechanizmach zapobiegania ujemnym wpływom stresorów na funkcje wewnątrzkomórkowe. Najważniejszą funkcją HSP90 jest współdziałanie w regulacji cytoszkieletu, podczas gdy grupa HSP110 jest czynnościowo związana z HSP70. Aktywność włókien mięśniowych przebiega na tle wpływu na nie różnorodnych mechanicznych i fizjologicznych stresorów. W oddziaływaniu tym powstają różne wewnątrzkomórkowe zmiany, mające także znaczenie adaptacyjne. Wykazano, że czynność mięśni prowadzi szczególnie do zmian HSP27, HSP72 i HSP73. Podczas aktywności włókien mięśniowych występują m.in. objawy stresu oksydacyjnego, w którym powstające reaktywne formy tlenu oddziałują jako drugie przekaźniki. Wpływają one na ekspresję genową, zwłaszcza na czynnik transkrypcyjny NFκB, który kontroluje indukcję apoptozy. W większych stężeniach reaktywne formy tlenu uszkadzają struktury komórkowe, prowadząc do uwolnienia TNFα i do apoptozy lub do zwią-

* Praca naukowa finansowana ze środków Ministra Nauki w latach 2002–2005 jako projekt badawczy Nr 3P05D 090 23.

szenia Ca^{2+} w sarkoplazmie, aktywując endonukleazę i w efekcie nekrozę. Indukcja HSP w tej sytuacji wchodzi w skład strategii antyoksydacyjnej, osłaniając mitochondria oraz aktywując leukocytozę i przeciwzapalne cytokiny. Przebieg powyższych reakcji jest uwarunkowany rodzajem wysiłku, jego intensywnością i czasem wykonania i przypuszczalnie jest częścią mechanizmów prowadzących do adaptacji wysiłkowej.

Słowa kluczowe: białka stresowe, wysiłek fizyczny, stres oksydacyjny, apoptoza.

Summary: Intracellular protein destroying and impairment of their synthesis result in disturbance of cell homeostasis and can lead to cell death. Counteracting these changes the cell induces synthesis of stress proteins among others. Physical exercise has stress attributes, especially if it is a long-lasting and intensive one. It can be assumed that this will bring about an intensification of stress protein expression what was experimentally confirmed. However the significance of this reaction is not fully clear taking into account the variety of functions the stress protein act in the organism. Stress proteins, called also heat shock proteins (HSP) display mainly the enzymatic function used in a direct protection against negative effects of stress. Taking into account their molecular weight one can distinguish two main groups of HSP, the low-molecular and high-molecular ones. HSPs belonging to the low-molecular group act mainly as chaperons and facilitate the degradation of destroyed proteins. Some of them, as HSP27 and HSP40, enhance the protective potential of other stress proteins. In high-molecular group one can distinguish HSP60, HSP70 and HSP90. As the mostly known and important for humans is HSP70. Stress proteins of this group act against protein aggregation and refolding of denaturated and non-native proteins, and in removing them out of the cell. They act as chaperons of polypeptides synthesized along ribosomes and participate in protecting mechanisms against negative influences of stressors on intracellular processes. Main role of HSP90 is a cooperation in the regulation of cytoskeleton function, and HSP110 is functionally related to HSP70. The activity of muscle fibers is performed against a background enclosing influences of numerous mechanical and physiological stressors. During this activity there appear various intracellular changes having adaptative value. It has been shown that muscular activity particularly in changes of HSP27, HSP72 and HSP73 amounts. During the muscular activity there appear preliminary signs of reactive stress where the reactive oxygen species act as second messengers. They influence upon the gene expression, especially upon the transcription factor NF κ B being an apoptosis induction factor. In higher concentrations the reactive oxygen species destroy cell structure giving the appearance of TNF α and apoptosis, or an enhancing of Ca^{2+} concentration in sarcoplasm with the activation of endonuclease, resulting finally in necrosis. The HSP induction is in this situation a part of anti-oxidant defense strategy, acting as mitochondrial protection, and inducing leukocytosis and activating anti-inflammatory cytokines. The course of the above reactions is determined by the character of exercise, its intensity and performing time, and they are probably a part of mechanisms resulting in work adaptation.

Key words: stress proteins, physical exercise, oxidative stress, apoptosis.

Wysiłek fizyczny wywołuje wielokierunkowe zmiany wewnątrzustrojowe. Najbardziej poznane są reakcje biochemiczne i hormonalne, lecz ostatnie lata przynoszą coraz nowsze informacje o odchyleniach w różnych innych procesach wewnątrzkomórkowych, które zmieniają czasowo funkcję danych komórek. Procesy te są kontrolowane nie tylko przez tzw. hormony stresowe (katecholaminy, kortyzol, hormon wzrostu), lecz także przez całą gamę zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych substancji regulacyjnych [1, 8, 9, 18, 35]. Zmiany, powstające we włóknach mięśniowych i poza układem ruchu, mają służyć adaptacji do obciążeń fizycznych, których charakter w dużym stopniu odpowiada reakcji stresowej. We włóknach mięśni szkieletowych obejmują one białka kurczliwe i cytoszkieletu, enzymy przemian energetycznych, ilościową zawartość substratów energetycznych i równowagę jonową. Niewiele jest jednak danych na temat regulatorów wewnątrzkomórkowych, które uczestniczą w przekształcaniu włókien mięśniowych [23,

33, 41]. Ze względu na stresowy charakter wysiłku fizycznego zmiany wywołane pracą fizyczną mogą mieć dodatni i ujemny aspekt. Dodatnie efekty powstają zazwyczaj i są podstawą wykorzystania różnych form ćwiczeń w promocji zdrowia i rehabilitacji w uszkodzeniach chorobowych. Pytania, które powstają w tym kontekście, a dotyczą wymiaru wysiłku mającego dodatni, prozdrowotny efekt, nie uzyskały dotąd zadowalających odpowiedzi. Wydaje się, że główną przyczyną kontrowersji w interpretacji zmian powysiłkowych są stany ustroju, do których te zmiany są odnoszone. Podstawowym, jak się wydaje, zagadnieniem fizjologicznym, które może być przydatne w ocenie korzystnych efektów wysiłku fizycznego, jest prześledzenie dynamiki wielokierunkowych zmian w przekształcaniach adaptacyjnych.

Powysiłkowe zmiany metaboliczne są dziedziną, w której procesy adaptacyjne mogą być stosunkowo łatwo oceniane. Zmiany te uwidoczniają się m.in. jako zwiększona aktywność enzymów nadzorujących przemiany tlenowe substratów energetycznych oraz jako wzrost ilościowy mitochondriów [31, 36]. Poszukując czynników inicjujących mitochondrialną biogenezę, zwrócono uwagę, że podczas wysiłku następuje interakcja małych, wielokrotnych zmian w stężeniu 5'-AMP z białkami regulującymi ekspresję genów mitochondrialnych [3]. Charakter tych reakcji nie jest dotąd znany. Stwierdzono, że w homeostazie ATP i biogenezie mitochondriów szczególną rolę wydają się odgrywać białka stresowe [2, 3, 7]. Białka związane ze stresem (HSP – *heat shock proteins*) są grupą wysoce konserwatywnych związków, o masie cząsteczkowej 10 kDa do 170 kDa, które występują w komórkach wszystkich organizmów żywych. W spoczynku występują w niskich stężeniach, głównie jako formy stabilne (*cognate*), lecz w przypadku oddziaływania różnych środowiskowych stresorów, ich stężenie szybko się zwiększa. Jako podstawę podziału białek stresowych na grupy przyjmuje się ich masę cząsteczkową, co jest związane także z ich fizjologicznym znaczeniem. Czasem wyróżnia się dodatkowo białka glukozy-zależne (GRP – *glucose-regulated proteins*) i białka stresu oksydacyjnego (OSP – *oxidative stress proteins*) [28, 40]. W grupie białek stresowych wyróżnia się grupy: HSP8-32 (wśród nich HSP10, czy HSP40) oraz białka o wyższej masie cząsteczkowej HSP60; HSP70; HSP90. Indukcja syntezy HSP jest pierwotnie regulowana na poziomie transkrypcji za pośrednictwem rodziny czynników stresu cieplnego (HSF – *heat shock factors*), które reagują ze specyficznym czynnikiem regulacyjnym HSE (*heat shock promoter element*) znajdującym się w obrębie genów *hsp* (tab. 1) [29].

Doświadczalnie udowodniono, że indukcja syntezy HSP może nastąpić pod wpływem m.in. wzrostu temperatury, niedokrwienia i niedotlenienia, kwasicy, wzrostu cytosolowego stężenia Ca^{2+} i reaktywnych form tlenu, obniżonej biodostępności glukozy, degradacji białek oraz endotoksemii [4]. Wszystkie te zmiany stwierdza się podczas wysiłku fizycznego, zwłaszcza wykonywanego w dłuższym czasie. Podczas wysiłków submaksymalnych długotrwała intensyfikacja przemian energetycznych powoduje we włóknach mięśniowych wzrost temperatury do 44°C oraz obniżenie zawartości glikogenu. Obniża się także pH i podwyższa stężenie mleczanu w mięśniach i we krwi (tab. 2) [4, 5, 35].

TABELA 1. Rodziny białek stresu ciepłego, ich lokalizacja i główne funkcje w komórce [6, 30, 34]

Rodzina	Białko	Lokalizacja	Główna funkcja
sHSP HSP8-32	HSP10, HSP17, HSP 27, HSP28 α A krystalina α B krystalina	Cytozol	Stabilizacja białek zapobiegająca ich agregacji
HSP60	HSP32, HSP40 HSP47 HSP58, GRP58 HSP60/ HSP10-mito HSP60/ HSP10-cyt (chaperonin)	Mitochondria Cytozol	Rozwijanie struktury i zapobieganie agregacji zdenaturowanych białek
HSP70	HSP68, HSP70.1, HSP70.2, HSP70.3 mHSP70 HSC70, HSC73 GRP75 GRP78	Cytozol/jądro Mitochondria Cytozol/jądro Retikulum Retikulum	Zwijanie, łączenie i transport powstających polipeptydów, ich przez błonową translokacja, transport do różnych organelli, rozwijanie zdenaturowanych białek
HSP90	HSP83, HSP87, HSP90 α HSP90 β HSP90 N GRP94 HSP104, HSP105, HSP110, GRP170	Cytozol Cytozol Cytozol/jądro Retikulum Cytozol/jądro	Udział w wykształcaniu się konformacji receptorów steroidowych i kinaz przenoszących sygnały

W ostatnich latach uzyskano dodatkowe informacje istotne dla zrozumienia zjawisk adaptacyjnych we włóknach mięśniowych. Analizując rolę reaktywnych form tlenu (ROS) omawiane jest zazwyczaj ich negatywne oddziaływanie na funkcje mięśni, odpowiedzialne m.in. za powstawanie uszkodzeń czynnościowych i strukturalnych [więcej w 10, 16, 17, 21, 38]. Niezależnie od stanu czynnościowego mięśni, ROS są stale w nich wytwarzane. Oddziałując na metabolizm energetyczny i ekspresję genów oraz na przepływ krwi przez mięsień są modyfikatorami procesu skurczowego [32]. Jest wysoce prawdopodobne, że powyższe, fizjologiczne znaczenie ROS związane jest z ich stężeniem w miejscu powstania. W stężeniach wyższych ROS stają się toksyczne dla środowiska wewnątrzkomórkowego. Uszkadzają struktury białkowe i lipidowe i mogą powodować fragmentację kwasów nukleinowych. W zależności od wysokości stężeń prowadzi to do apoptozy lub nekrozy. Indukcja HSP w odpowiedzi na stres wysiłkowy ma znaczenie ochronne, podczas gdy apoptoza wywołana przez ROS jest przyjmowana jako proces prowadzący do śmierci komórki [34].

Czynniki indukujące apoptozę generują zazwyczaj ROS lub hamują obronę antyoksydacyjną. W niskich stężeniach endogenne ROS pełnią rolę drugiego przekaźnika, uczestnicząc w kontroli ekspresji genowej. Modułują zwłaszcza aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF κ B) i aktywowane białko-1 (AP-1), które jako czynniki transkrypcyjne oddziałują na indukowaną ekspresję szeregu genów związanych

z apoptozą [13, 30, 34]. Wyższe stężenia ROS indukują apoptozę i przeciwdziałające jej różne formy HSP.

Znaczenie występowania apoptozy we włóknach mięśniowych, które są komórkami wielojądrzastymi, nie jest w pełni zrozumiałe. Efekt ten prowadzi do zaniku i usunięcia zazwyczaj niektórych tylko jąder lub innych organelli włókna. Nie zostało dotąd wyjaśnione, jaki jest zakres tych zmian oraz jakie dodatkowe procesy im towarzyszą. Nasilenie procesów apoptotycznych jest proporcjonalne do intensywności i czasu wysiłku [26, 27]. Po długotrwałych wysiłkach, obok innych uszkodzeń strukturalnych, zmiany apoptotyczne stwierdza się także w jelitach, nerkach, wątrobie i w sercu [15, 24, 25].

Indukcja syntezy HSP w wysiłku fizycznym następuje za pomocą kilku zróżnicowanych mechanizmów. Przeniesienie zewnątrzkomórkowych mechanicznych oddziaływań stresowych do wnętrza włókien mięśniowych dochodzi do skutku poprzez kaskadę kinazy proteinowej aktywowanej mitogenem MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Jak wykazano, różne formy aktywności mięśniowej wykorzystują w tym celu drogi sygnałów kinaz JNK (*c-jun N-terminal kinase*) i ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) oraz białka p35. Jak się wydaje, reakcje te zależne są od charakteru wysiłku. Thomson i inni [39] stwierdzili, że intensywne wysiłki ekscentryczne wywołują w biopsjach *m. biceps brachii* wzrost stężenia HSP27 i HSP70, podczas gdy bieg na bieżni mechanicznej, nachylonej ujemnie (-10°) indukuje w *m. vastus lateralis* wzrost stężenia tylko HSP70. Są też dane, że nasilenie syntezy HSP70 jest proporcjonalne do intensywności wysiłku [11] oraz że ekspresja HSP może być zależna od typu włókna mięśniowego [2].

We włóknach mięśniowych zadaniem HSP, poza ich związkiem z układem immunologicznym, jest udział w translokacji, fałdowaniu i gromadzeniu białek mitochondrialnych. Są one molekularnymi białkami opiekuńczymi, łączącymi się ze zdenaturowanymi białkami, działając jako katalizatory ich degradacji. Spośród wszystkich grup białek stresowych w czasie wysiłku najbardziej zmienia się stężenie HSP70. Forma stabilna, HSC73 jest mało wrażliwa na jednorazowy wysiłek i jej stężenie jest podobne

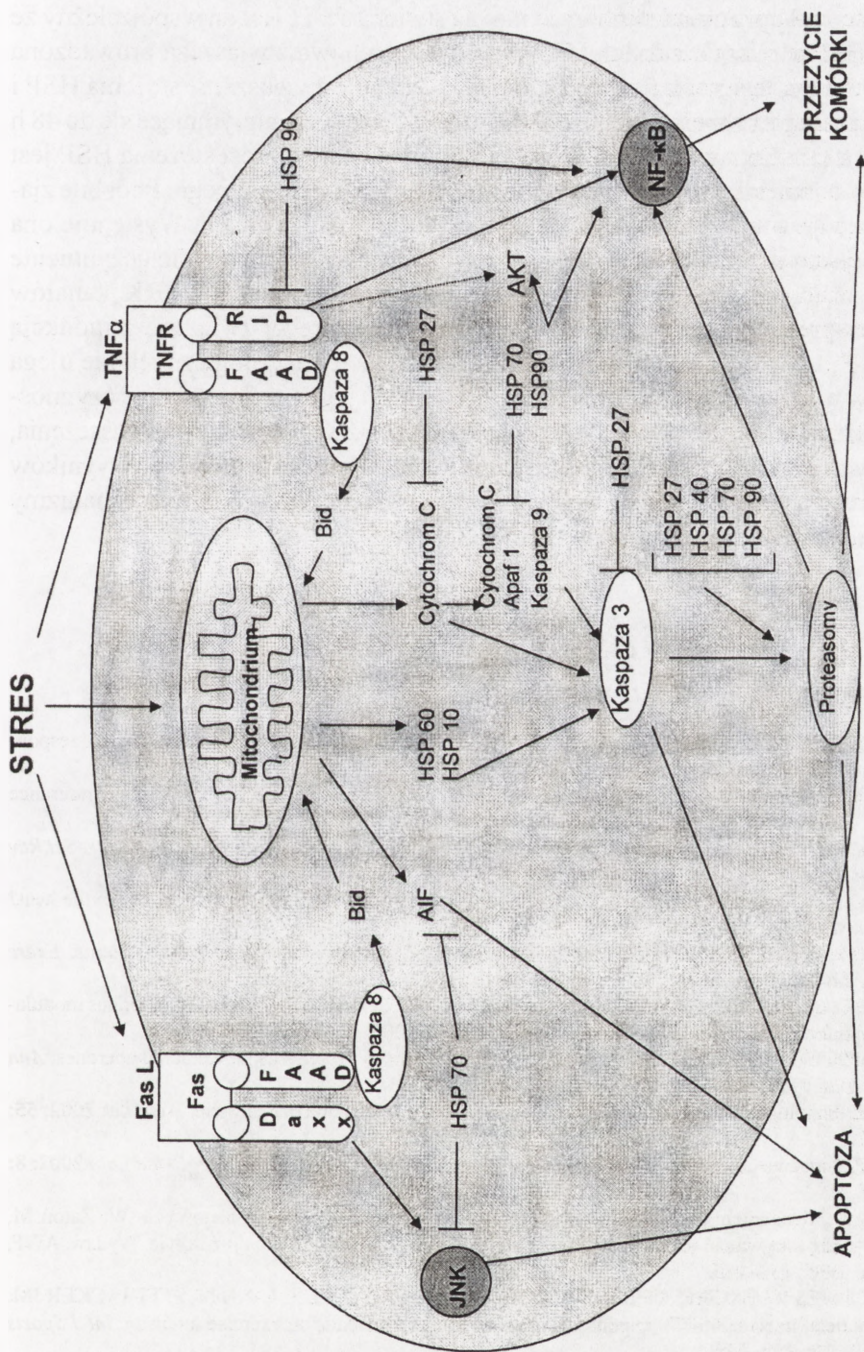
TABELA 2. Warunki, które mogą stymulować ekspresję białek stresu cieplnego [30]

Fizjologiczne	Patologiczne	Środowiskowe
Cykl komórkowy Rozwój i różnicowanie się komórek Czynniki wzrostowe Stymulacja hormonalna	Infekcje wirusowe Infekcje bakteryjne Infekcje pasożytnicze Gorączka Denaturacja białek Proces zapalny Niedokrwienie Niedotlenienie Reperfuzja Hipertrofia Stres oksydacyjny Stres neurohormonalny Uszkodzenia tkanek i procesy naprawcze Toksyny Lipopolisacharydy Autoimmunizacja Starzenie się	Szok termiczny (zimno, ciepło) Reaktywne formy tlenu Metale ciężkie Etanol Antybiotyki Promieniowanie jonizujące Czynniki mechaniczne

we wszystkich typach włókien. Stężenie to ulega podwyższeniu dopiero w wyniku treningu wytrzymałościowego. Stężenie formy indukowanej - HSP72, zmienia się istotnie w ciągu godzin po wysiłku i wzrost ten jest prawdopodobnie zależny od potencjału oksydacyjnego włókna. Obie formy występują w sarkoplazmie i w jądrze komórkowym. W mitochondriach występuje HSP60, które przejmuje syntetyzowany polipeptyd, dostarczany przez HSP70. Ułatwia ono polipeptydowi uzyskanie końcowej struktury. Podobną funkcję ma GRP75, czynne w translokacji niedojrzałych polipeptydów przez błonę mitochondrialną i w ich fałdowaniu wewnątrz mitochondriów. Obie formy: HSP60 i GRP75 są syntetyzowane w zwiększonej ilości podczas treningu fizycznego [14, 20]. Zarówno potencjał przemian tlenowych (cyklu kwasów trójkarboksylowych i łańcucha cytochromów), jak też stężenie białek grupy HSP70 wzrastają w wyniku treningu [2]. Sugeruje to, że HSP biorąc udział w syntezie enzymów mitochondrialnych mogą być jednym z czynników indukujących efekty treningu wytrzymałościowego. Są też wyniki wskazujące na fakt, że podczas wysiłków oporowych następuje szczególnie silna ekspresja mitochondrialnego RNA odpowiedzialnego za syntezę HSP70 i HSP27 [39]. Nie uzyskano jednak dotąd pewnych dowodów na to, że powyższe efekty treningowe są zależne od stężenia i aktywności HSP.

Indukcja przez stres oksydacyjny syntezy HSP i uruchomienie kaskady kaspaz (proteaz cysteinowych) nasuwają przypuszczenie, że ROS są wspólnym sygnałem dla tych procesów. Jedną z głównych odpowiedzi na stres komórkowy jest synteza HSP. Odpowiedź ta pojawia się szczególnie wyraźnie podczas niskich intensywności działania stresora [34]. W warunkach tych ROS są czynnikami, które biorą udział w kontroli ekspresji różnych genów. Niektóre z tych kontrolnych reakcji zapoczątkowują kaskadę kaspazową poprzez np. TNF α , NF κ B lub zespół czynników zawartych w AP-1. Celem jest usunięcie zużytych lub uszkodzonych białek enzymatycznych lub strukturalnych, a także śmierć komórki. We włóknie mięśniowym powyższe reakcje spotyka się przede wszystkim w mitochondriach, co może w efekcie regulować lub przyspieszać przebieg apoptozy. Można przyjąć, że sarkoplazmatyczne zmiany degradacyjne wywołane przez ROS powstają w późniejszym okresie i podczas bardziej intensywnych wysiłków, powodujących przejście elementów degradacji białek poza mitochondria. To samo dotyczy błonowych struktur włókien, uszkodzanych w wyniku peroksydacji lipidów. Zostało to potwierdzone doświadczalnie, co pozwoliło opracować koncepcję PTP (*permeability transition pore*) [12].

Interakcja między ROS (w tym również tlenku azotu), indukcja syntezy HSP i zapoczątkowanie kaskady kaspazowej (apoptoza) oraz jej zależność od charakteru wysiłku sugerują określoną rolę tych zjawisk w adaptacji wysiłkowej. Zróżnicowanie fizykochemicznych i fizjologicznych właściwości oraz czynnościowego ukierunkowania włókien mięśniowych rozpoczyna się w momencie budowy szkieletu filamentów miozynowych. Włókna różnią się między sobą głównie zawartością rodzaju izoform ciężkiego łańcucha miozynowego. Aktywność mięśni, zwłaszcza trening fizyczny, może powyższe różnice zmieniać, modyfikując właściwości włókien. Jak potwierdzają wyniki badań z ostatnich lat, modyfikacje te dotyczą nie tylko filamentów miozynowych, lecz powodują także przekształcanie innych białek miofibrylarnych oraz zmiany białek sarkoplazmatycznych i błonowych [31, 36, 41]. Aktywacja apoptozy miałaby w tym



RYCINA 1. Prawdopodobny mechanizm regulacji apoptozy przez białka stresu cieplnego [6, 22, 37] w modyfikacji własnej: AIF (*apoptosis inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę, AKT (*kinase*) – kinaza, Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) – czynnik apotypyczny aktywujący proteazy, Bid (*Bcl-2-family protein*) – białko z rodziny Bcl-2, Daxx (*adapter protein that contains death domain*) – białko adaptorowe zawierające domenę śmierci, FAAD (*Fas associated death domain protein*) – białko związane z domeną śmierci receptora Fas, RIP (*receptor interacting protein*) – białko współdziałające z receptorem

wanych do wymogów obciążeń treningowych. Odpowiednie formy HSP miałyby za zadanie kontrolę i nadzór nad procesami restrukturyzacji włókien. Ograniczając się tylko do potencjału przemian tlenowych można stwierdzić, że jest on współzależny ze stężeniem HSP w mitochondriach [5]. Aktywność ruchowa, zwłaszcza prowadzona w formie treningu, tę współzależność zmienia. Następuje zwiększenie stężenia HSP i mRNA związanego z określonymi formami białek stresowych, utrzymujące się do 48 h po wysiłku, a czasem nawet dłużej [2, 5, 19]. Powysiłkowy wzrost stężenia HSP jest ograniczony do mięśni, które były aktywne i nie ma charakteru ogólnego. Podobne zjawisko występuje w odniesieniu do apoptozy powstałej w mięśniach. Występuje ona również miejscowo, we włóknach ruchowo czynnych. Następuje ponadto uczynnienie niektórych szlaków sygnałowych. Stwierdza się aktywację kinaz JNK/ERK, kanałów PTP oraz ekspresję wczesnych genów, jak *jun* i *fos*, które są związane z indukcją syntezy HSP i apoptozy. Włókno mięśniowe w warunkach fizjologicznych nie ulega degradacji w wyniku apoptozy. Stwierdza się natomiast jego przekształcenie czynnościowe i strukturalne, przystosowujące je do nowych obciążeń. Powyższe przypuszczenia, wysoce prawdopodobne w świetle dotychczasowych, zwłaszcza najnowszych wyników badań, wymagają jednak dalszych analiz, zwłaszcza ukierunkowanych na mechanizmy powstawania przekształceń wewnątrzkomórkowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BRENNER I, SHEK PN, ZAMECNIK J, SHEPHARD RJ. Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med* 1998; **19**: 130–143.
- [2] ECOCHARD L, LHENRY F, SEMPORÉ B, FAVIER R. Skeletal muscle HSP72 level during endurance training: influence of peripheral arterial insufficiency. *Pflug Arch* 2000; **440**: 918–924.
- [3] ESSIG DA. Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 1996; **24**: 289–319.
- [4] FEBBRAIO MA. Does skeletal muscle function and metabolism affect exercise performance in the heat? *Exerc Sport Sci Rev* 2000; **28**: 171–177.
- [5] FEHRENBACH E, NORTHOFF H. Free radicals, exercise, apoptosis and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 2001; **7**: 66–89.
- [6] GARRIDO C, GURBUXANI S, RAVAGNAN L, KROEMER G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; **286**: 433–442.
- [7] GEORGOPOULOS C, WELCH WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Ann Rev Cell Biol* 1993; **9**: 601–634.
- [8] JETHON Z. Fizjologiczne mechanizmy aktywności fizycznej w działaniu na zdrowie. *Wiad Lek* 2002; **55**: 170–177.
- [9] JETHON Z. Stresowe aspekty wysiłku fizycznego w sporcie i w lotnictwie. *Pol Przegl Med Lotn* 2002; **8**: 387–395.
- [10] JETHON Z. Mechanizm powstawania wysiłkowego uszkodzenia mięśni szkieletowych. W: Zatoń M, Jethon Z [red.] Aktywność ruchowa w świetle badań fizjologicznych i promocji zdrowia. Wydaw. AWF, Wrocław 1998: 153–165.
- [11] LIU Y, LORMES W, BAUR C, OPITZ-GRESS A, ALTENBURG D, LEHMANN M, STEINACKER JM. Human skeletal muscle HSP70 response to physical training depends on exercise intensity. *Int J Sports Med* 2000; **21**: 351–355.
- [12] LY J.D, GRUBB DR, LAWEN A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003; **8**: 115–128.

- [13] MATÈS JM, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; **32**: 157–170.
- [14] MATTSON JP, ROSS CR, KILGORE JL, MUSCH TI. Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. *Med Sci Sports Exercise* 2000; **32**: 365–369.
- [15] MURAWSKA-CIAŁOWICZ E, PODHORSKA-OKOŁÓW M, JETHON Z, DZIĘGIEL P, JANUSZEWSKA L. Zmiany czynnościowe i strukturalne w komórkach nerki po wysiłku fizycznym. *Probl Higieny* 2003; **83**: 190–191.
- [16] MURAWSKA-CIAŁOWICZ E. Wpływ różnych czynników na zmiany w śródbłonku naczyń krwionośnych. W: Zatoń M, Jethon Z [red.] Aktywność ruchowa w świetle badań fizjologicznych. Wydaw. AWF, Wrocław 2002: 89–102.
- [17] MURAWSKA E, JETHON Z. Stres oksydacyjny i antyoksydacyjna obrona w fizjologicznych i patologicznych stanach organizmu. W: Zatoń M, Jethon M [red.] Aktywność ruchowa w świetle badań fizjologicznych i promocji zdrowia. Wydaw. AWF, Wrocław 1998: 27–39.
- [18] NIKOLAIDIS MG, PAPANIS KT, KORTSARIS AH, MOUGIOS V. Exercise-induced changes in c-Fos protein levels in skeletal muscle of trained and untrained rats. *Int J Sports Med* 2003; **24**: 96–100.
- [19] NOBLE EG, MORASKA A, MAZZEOP RS, ROTH DA, OLSSON MC, MOORE RL, FLESHNER M. Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol* 1999; **86**: 1696–1701.
- [20] OISHI Y, TANIGUCHI K, MATSUMOTO H, ISHIHARA A, OHIRA Y, ROY RR. Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. *J Appl Physiol* 2002; **92**: 1097–1103.
- [21] PALAZZETTI S, RICHARD M-J, FAVIER A, MARGARITIS I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003; **28**: 588–604.
- [22] PARCELLIER A, GURBUXANI S, SCHMIDT E., SOLARY E, GARRIDO C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; **304**: 505–512.
- [23] PETTE D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol* 2002; **27**: 423–448.
- [24] PODHORSKA-OKOŁÓW M, DZIĘGIEL P, GOMUŁKIEWICZ A., DOLIŃSKA-KRAJEWSKA B., MURAWSKA-CIAŁOWICZ E, JETHON Z, ZABEL M. The role of AT1 and AT2 angiotensin receptors in the mechanism of apoptosis in renal tubular cells after physical exercise. *Ann Acad Med Bialostocensis* 2004; **49** Suppl 1: 8–10.
- [25] PODHORSKA-OKOŁÓW M, DZIĘGIEL P, MURAWSKA-CIAŁOWICZ E, KRAJEWSKA B, CIESIELSKA U, JETHON Z, ZABEL M. Exercise-induced apoptosis in the renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol* 2004; **63**: 213–216.
- [26] PODHORSKA-OKOŁÓW M, KRAJEWSKA B, CARRARO U, ZABEL M. Apoptosis in mouse skeletal muscle after physical exercise. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 127–128.
- [27] PODHORSKA-OKOŁÓW M, SANDRI M, ZAMPIERI S, BRUN B, ROSSINI K, CARRARO U. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; **24**: 518–531.
- [28] POWERS SK, LOCKE M, DEMIREL HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc* 2001; **33**: 386–392.
- [29] PRIKKALA L, NUKANEN P, SILSTONEN L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 2001; **15**: 1118–1131.
- [30] PROHÁSZKA Z, FÜST G. Immunological aspects of heat-shock proteins – the optimum stress of life. *Mol Immunol* 2004; **41**: 29–44.
- [31] PUTMAN CHT, XU X, GILLIES E, MACLEAN IM, BELL GJ. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. *Eur J Appl Physiol* 2004; **92**: 376–384.
- [32] REID MB. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; **33**: 371–376.
- [33] SANDRI M, CARRARO U. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *IJBCB* 1999; **31**: 1373–1390.
- [34] SREEDHAR AS, CSERMELY P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharmac Therap* 2004; **10**: 227–257.
- [35] STEINACKER JM, LORMES W, REISSNECKER S, LIU Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur J Appl Physiol* 2004; **91**: 382–391.

- [36] STEVENS L, BASTIDE B, BOZZO C, MOUNIER Y. Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 2004; **448**: 507–514.
- [37] TAKAYAMA S, REED JC, HOMMA S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 2003; **22**: 9041–9047.
- [38] THACKER SB, GILCHRIST J, STROUP DF, KIMSEY CD. jr. The impact of stretching on sports injury risk: a systematic review of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 2004; **36**: 371–378.
- [39] THOMPSON HS, MAYNARD EB, MORALES ER, SCORDILIS SP. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003; **178**: 61–72.
- [40] XU Q. Role of the heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 1547–1559.
- [41] ZATOŃ M, JETHON Z. Możliwości adaptacyjne włókien mięśniowych. W: Murawska-Ciałowicz E, Zatoń M [red.] Znaczenie aktywności ruchowej dla zdrowia. Wydaw. AWF, Wrocław 2005: 7–21.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.11.2005 r.

Przyjęto: 27.10. 2005 r.

51-612 Wrocław, ul. Paderewskiego 35

e-mail: jethon@awf.wroc.pl

CZYNNIK INDUKOWANY PRZEZ HIPOKSJĘ-1 (HIF-1): BUDOWA, REGULACJA EKSPRESJI, FUNKCJA ORAZ ROLA W PROGRESJI NOWOTWORÓW*

HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 (HIF-1): STRUCTURE, REGULATION
OF EXPRESSION, FUNCTION AND THE ROLE IN TUMOR PROGRESSION

Konrad KRSZYNA, Tomasz STOKŁOSA

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Jednym z głównych komponentów odpowiedzi komórki na brak tlenu jest czynnik transkrypcyjny o charakterze heterodimeru - HIF-1 (z ang. *hypoxia inducible factor-1* = czynnik indukowany przez hipoksję). W normoksji HIF-1 jest konstytutywnie produkowany i degradowany przez układ ubiquityny i proteasomu, natomiast ulega stabilizacji i wykazuje aktywność czynnika transkrypcyjnego w warunkach hipoksji. Hipoksja jest typową cechą rosnącego guza nowotworowego, a zwiększona aktywność HIF-1, obserwowana w wielu nowotworach, uważana jest za jeden najważniejszych czynników odpowiedzialnych za aktywację angiogenezy nowotworowej. Dlatego lepsze zrozumienie funkcji HIF-1 może pomóc w stworzeniu nowych terapii przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe: HIF-1, hipoksja, nowotwór, angiogeneza nowotworowa.

Summary: One of the major components of the cellular response to oxygen deprivation is a heterodimeric transcription factor - hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 is constitutively produced and degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions but becomes stabilized and transcriptionally active under hypoxic conditions. Hypoxia is one of the typical features of growing tumor and enhanced activity of HIF-1 observed in several different malignancies, is one of the most important factors responsible for activating pathways leading to tumor angiogenesis. Therefore better understanding of HIF-1 function may provide new targets for tumor therapy.

Key words: HIF-1, hypoxia, tumor, tumor angiogenesis.

*Praca częściowo finansowana z projektu młodego badacza AM w Warszawie 1M19/WB2/2005 (T.S.)

1. WSTĘP

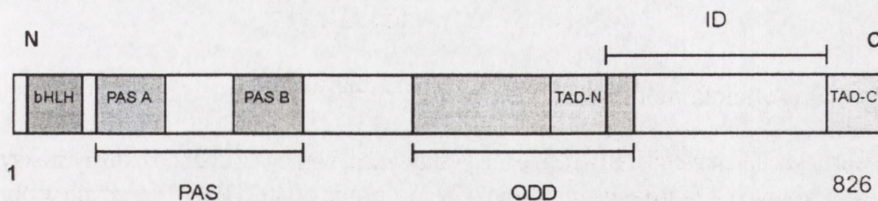
Organizmy wielokomórkowe w toku ewolucji uzależniły się od tlenu. Jako końcowy akceptor elektronów w łańcuchu oddechowym, zapewnia on produkcję odpowiedniej ilości ATP, umożliwiającej organizmowi przeżycie i dalszy rozwój. Stale trwający proces ewolucji doprowadza do selekcji tych osobników, którzy są w stanie najlepiej dostosować się do postępujących zmian w środowisku, w którym przebywają. Aby dana zmiana utrwaliła się na poziomie makroskopowym, musi jednak najpierw dojść do zmian w obrębie komórek tworzących makroorganizm. Zaburzenia homeostazy ustroju wymuszają na komórkach procesy kompensacyjne i adaptacyjne, mogące doprowadzić do jej przywrócenia do wartości początkowych, lub ustabilizowanie na nowym poziomie. Jednym z najgroźniejszych stresów, jakim mogą podlegać komórki, jest zaburzenie dostawy tlenu, powodujące stan hipoksji. Hipoksją dla większości komórek jest spadek stężenia O_2 poniżej 2%, przy czym wartości 1–2% uważa się za stan umiarkowanej hipoksji, przy stężeniu poniżej 0,2% mówimy o głębokiej hipoksji i anoksji. Komórki, aby przetrwać, muszą albo dostosować się do nowych warunków, przestawiając się na metabolizm beztlenowy, albo przywrócić odpowiednie utlenowanie tkanek. Komórki nowotworowe są szczególnie narażone na hipoksję ze względu na ich dużą gęstość i słabe unaczynienie, co pogarsza ich zaopatrzenie w tlen. Z tego powodu hipoksja stała się cechą charakterystyczną dla większości nowotworów. Warunki te doprowadzają do selekcji komórek, które uległy mutacjom, umożliwiającym im przeżycie w tych trudnych warunkach. Głównym czynnikiem transkrypcyjnym, zaangażowanym w adaptację komórek do stanu hipoksji jest HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor-1*). Jego rola w biologii nowotworów sprawia, że HIF-1 może okazać się dobrym celem dla terapii przeciwnowotworowych.

2. ODKRYCIE HIF-1

HIF-1 został odkryty w 1992 roku przez Semenza i wsp. podczas badań nad wzmocniaczem położonym w kierunku 3' od genu dla erytropoetyny (EPO). W jego obrębie wyizolowana została sekwencja, dzięki której dochodzi do znacznego wzrostu ekspresji genu dla erytropoetyny, w środowisku 1% O_2 . Z sekwencją tą wiązał się nowy czynnik transkrypcyjny, indukowany przez hipoksję (nazwany HIF-1, *hypoxia inducible factor-1*) [77]. Jego ekspresja wykazana została później w wielu różnych liniach komórkowych, co pomogło Semenza i wsp. sformułować pogląd, postulujący istnienie centralnego systemu regulującego odpowiedź komórkową w stanie hipoksji, w którą w dużej mierze zaangażowany jest HIF-1 [90].

3. BUDOWA

Prace nad wyizolowaniem oczyszczonej formy HIF-1 doprowadziły do scharakteryzowania dwóch peptydów wchodzących w jego skład. Okazało się, że składa się



RYCINA 1. Budowa HIF-1 α . HIF-1 α zbudowany jest z 826 aminokwasów. W jego N-końcowej części znajduje się domena bHLH (AA 17-71), oraz domena PAS (AA 85-298), składająca się z domeny PAS-A (AA 85-158) i domeny PAS-B (AA 228-298). W C-końcowej części znajdują się dwie domeny transaktywacyjne: TAD-N (AA 531-576) i TAD-C (AA 786-826), przedzielone domeną ID. W środkowej części położona jest domena ODD (AA 401-603), zawierająca w sobie domenę TAD-N

on z dwóch podjednostek, HIF-1 α (o masie 120 kDa) i HIF-1 β (o masie 91, 93 lub 94 kDa), bezpośrednio wiążących się z DNA (ryc. 1). Analiza sekwencji nukleotydowej cDNA HIF-1 wykazała, że obydwie jego podjednostki należą do rodziny czynników transkrypcyjnych PAS (nazwa od trzech pierwszych członków rodziny – Per, ARNT, Sim), a podjednostka HIF-1 β jest identyczna z białkiem ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), odkrytym już wcześniej. Mają one domenę b (ang. *basic*) odpowiedzialną za wiązanie z DNA, domenę helisa-pętla-helisa (ang. *helix-loop-helix* – HLH) odpowiedzialną za heterodimeryzację oraz domenę PAS (PAS-A i PAS-B) wspólną dla tej grupy czynników transkrypcyjnych. Domeny bHLH i PAS-A są wystarczające do prawidłowej heterodimeryzacji, natomiast optymalne wiązanie z DNA wymaga domeny PAS-B. Późniejsze badania wykazały obecność dwóch domen transaktywacyjnych, położonych w pobliżu C końca HIF-1 α , TAD-C i TAD-N (ang. *transactivation domain*), przedzielonych domeną inhibitorową (ang. *inhibitory domain* – ID) [3, 4]. Kluczową rolę w regulacji stabilności HIF-1 α okazała się odgrywać domena ODD (ang. *oxygen-dependent degradation domain*), której ubikwitynacja w warunkach tlenowych kieruje HIF-1 α na drogę degradacji w proteasomie [32].

Dotychczas odkryto także inne formy HIF- α : HIF-2 α i HIF-3 α , które podobnie jak HIF-1 α ulegają heterodimeryzacji z HIF-1 β i wydają się pełnić podobną do niego funkcję. Nie ulegają one jednak tak powszechnej ekspresji jak HIF-1 α , a ich obecność wykazuje specyfikę tkankową [93].

4. MECHANIZM DZIAŁANIA I REGULACJA FUNKCJI HIF-1

Wzajemna interakcja HIF-1 α i HIF-1 β jest niezbędna do wiązania się HIF-1 z DNA, a co za tym idzie, do pełnienia przez niego funkcji czynnika transkrypcyjnego. HIF-1 β (ARNT) jest białkiem konstytutywnie zlokalizowanym na terenie jądra komórkowego, natomiast aktywność HIF-1 α podlega skomplikowanej regulacji, co sprawia, że jego aktywacja jest często kojarzona z funkcjonowaniem czynnika transkrypcyjnego HIF-1.

4.1. Etapy aktywacji HIF-1 α

4.1.1. Konstytutywna degradacja

W warunkach tlenowych HIF-1 α nie ulega aktywacji, ponieważ dochodzi do hydroksylacji dwóch kluczowych w jego regulacji aminokwasów (proliny P402 i P564), leżących w obrębie ODD, przez enzymy należące do grupy 4-hydroksylaz prolinowych [36, 55]. Wykryto cztery takie enzymy istniejące w komórkach ludzkich – HPHs (ang. *HIF-1 α prolyl hydroxylases*), zwane także PHDs (ang. *prolyl hydroxylase domain-containing proteins*) [9, 64]. 4-Hydroksylazy modyfikujące HIF-1 α są di-oksygenazami wymagającymi jako substratu tlenu cząsteczkowego, wiazanego przez Fe(II), leżący w ich centrum aktywnym, oraz 2-oksoglutaranu [9]. Zmodyfikowana przez hydroksylację jednostka HIF-1 α jest rozpoznawana przez produkt genu von Hippel-Lindau (pVHL), który jedną ze swoich domen (domeną β) wiąże się z domeną TAD-N w obrębie HIF-1 α , drugą (ang. *elongin C binding domain – CBD*) z kompleksem kuliny Cul-2, elonginy B i C, który katalizuje reakcję ubikwitynacji domeny TAD-N, kierując HIF-1 α na drogę proteolizy w proteasomie [56,59,83].

4.1.2. Aktywacja

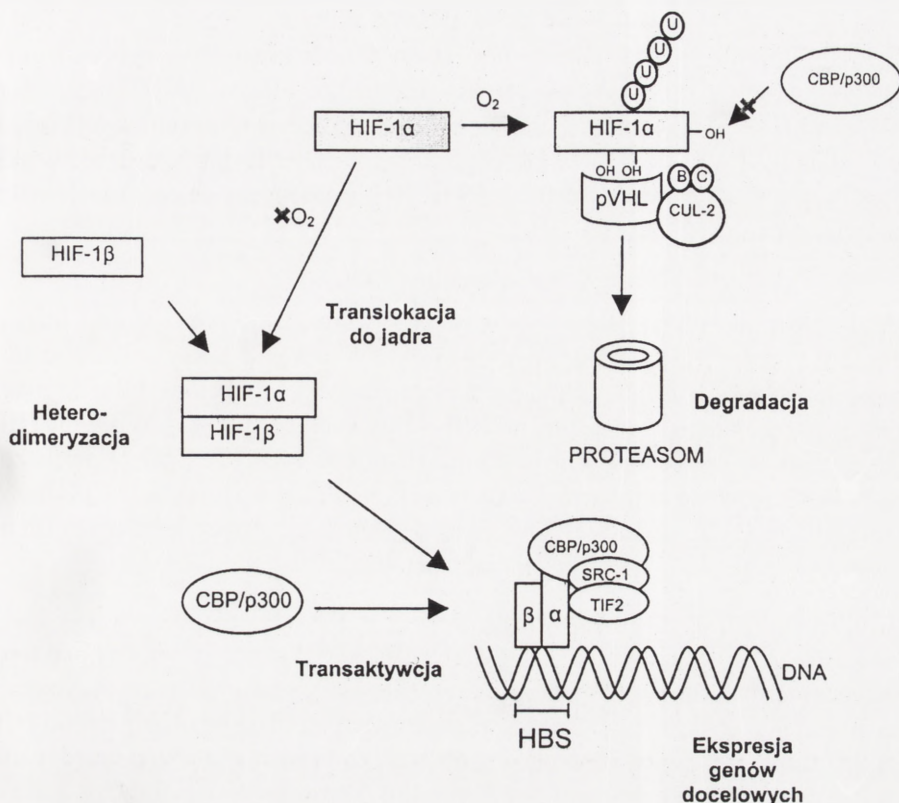
Aktywacja HIF-1 wymaga najpierw stabilizacji HIF-1 α , poprzez zahamowanie jego proteolizy. Poza stanem niedotlenienia do stabilizacji HIF-1 α przyczyniają się także czynniki interferujące z funkcją Fe(II), kluczowego dla prawidłowego funkcjonowania di-oksygenaz. Należy tu wspomnieć o chlorku kobaltu, który konkuruje z Fe(II) o centrum aktywne, oraz chelatorach żelaza, takich jak desferroksamina, obniżających pulę dostępnego Fe(II). Skuteczne zablokowanie 4-hydroksylaz prolinowych umożliwia gromadzenie się HIF-1 α w cytoplazmie i jego dalszą aktywację (ryc. 2) [93].

Mechanizm tlenowy jest głównym sposobem regulacji ilości i aktywności komórkowej puli HIF-1 α , choć wykryto także inne białka mogące się przyczyniać do jego stabilizacji, poprzez hamowanie ujemnych regulatorów HIF-1 α . Ważnym czynnikiem stabilizującym HIF-1 α , zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji, jest białko szoku cieplnego, Hsp90 (ang. *heat shock protein*). Białko to wiąże się z HIF-1 α , a jego inhibitor – geldanamycyna (GA) hamuje stabilizujące działanie Hsp90 i kieruje HIF-1 α na drogę degradacji w proteasomie, niezależnej od pVHL [34]. Również białko Jab1 (ang. *Jun activation domain-binding protein-1*) przyczynia się do stabilizacji HIF-1 α , głównie w stanie hipoksji, poprzez hamowanie jego interakcji z p53 [5].

Pewną rolę w stabilizacji HIF-1 α przypisuje się także jego translokacji do jądra komórkowego. W przypadku jej zahamowania, do degradacji HIF-1 α dochodzi w obecności pVHL nawet w warunkach hipoksji. Z drugiej jednak strony sama translokacja nie chroni HIF-1 α przed degradacją w warunkach tlenowych [83].

4.1.3. Modyfikacje posttranslacyjne

Już początkowe badania nad HIF-1 α wykazały duże znaczenie fosforylacji w aktywacji jego funkcji. Modyfikacja ta jednak nie wpływa na stabilizację HIF-1 α , lecz przyczynia się do zwiększenia aktywności transkrypcyjnej HIF-1. Wykazano, że do fosforylacji HIF-1 α dochodzi poprzez aktywację kinazy p42/p44, co częściowo tłumaczy



RYCINA 2. Mechanizm tlenowy regulacji HIF-1 α . Gen HIF-1 α podlega ciągłej transkrypcji, a następnie translacji, co sprawia, że białko stale pojawia się na terenie cytoplazmy. W warunkach tlenowych jest ono hydroksylowane w obrębie ODD przez 4-hydroksylazy prolinowe, co umożliwia jego wiązanie z pVHL. pVHL umożliwia następnie ubiquitynację HIF-1 α przez kompleks Cul-2 oraz elonginy B i C, co powoduje degradację HIF-1 α w proteasomie. W warunkach beztlenowych hydroksylacja HIF-1 α nie jest możliwa. Ulega on translokacji do jądra komórkowego, gdzie po dimeryzacji z HIF-1 β , połączeniu się z HBS i rekrutacji kofaktorów, takich jak: CBP/p300, SRC-1 czy TIF2, uruchamia transkrypcję genów docelowych

mechanizm stymulującego działania czynników aktywujących kaskadę kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases* – MAPK) na szlak HIF-1 [49, 90].

4.1.4. Translokacja do jądra komórkowego

HIF-1 α jest czynnikiem transkrypcyjnym, dlatego do spełnienia swojej funkcji musi przedostać się do jądra komórkowego. Podczas stanu niedotlenienia HIF-1 α ulega translokacji do jądra, gdzie dochodzi do aktywacji TAD-C, umożliwiając jej związanie się z CBP/p300 (ang. *CREB binding protein*). Proces ten uwarunkowany jest istnieniem motywu NLS (ang. *nuclear localization signal*) w części C-końcowej HIF-1 α [93]. W przypadku indukowanej nadekspresji HIF-1 α ulega on translokacji do jądra i pobudza ekspresję genów docelowych nawet w normoksji [30].

4.1.5. Heterodimeryzacja

Interakcja HIF-1 α z HIF-1 β na terenie jądra komórkowego, poza utworzeniem HIF-1, dodatkowo stabilizuje HIF-1 α w przypadku braku pVHL lub podczas stanu hipoksji. Kluczowym mechanizmem w tym procesie jest kompetycja między Hsp90 a domeną PAS HIF-1 β o wiązanie z domeną HLH/PAS, wchodzącą w skład HIF-1 α . Aktywowany kompleks HIF-1 α / HIF-1 β jest odporny na degradację stabilizując w ten sposób HIF-1 α [35].

4.1.6. Wiązanie z DNA

HIF-1 rozpoznaje i wiąże się z sekwencją HBS (ang. *HIF-1 binding site*), leżącą w obrębie HRE (ang. *hypoxia response element*). W obrębie HRE wykazano także obecność sekwencji HAS (ang. *HIF-1 ancillary sequence*), oddzielonej od HBS przez 8 par zasad, biorącej udział w zależnej od HIF-1 aktywacji genów [41]. Wiązanie HIF-1 z DNA okazało się być regulowane przez metylację dinukleotydu CpG. W większości komórek HBS nie ulega metylacji, jednak w niektórych liniach metylacja CpG hamuje wiązanie HIF-1 z HBS. Może być to mechanizm warunkujący specyfikę ekspresji genów regulowanych przez HIF-1 w różnych tkankach [90].

4.1.7. Przyłączanie kofaktorów transkrypcyjnych

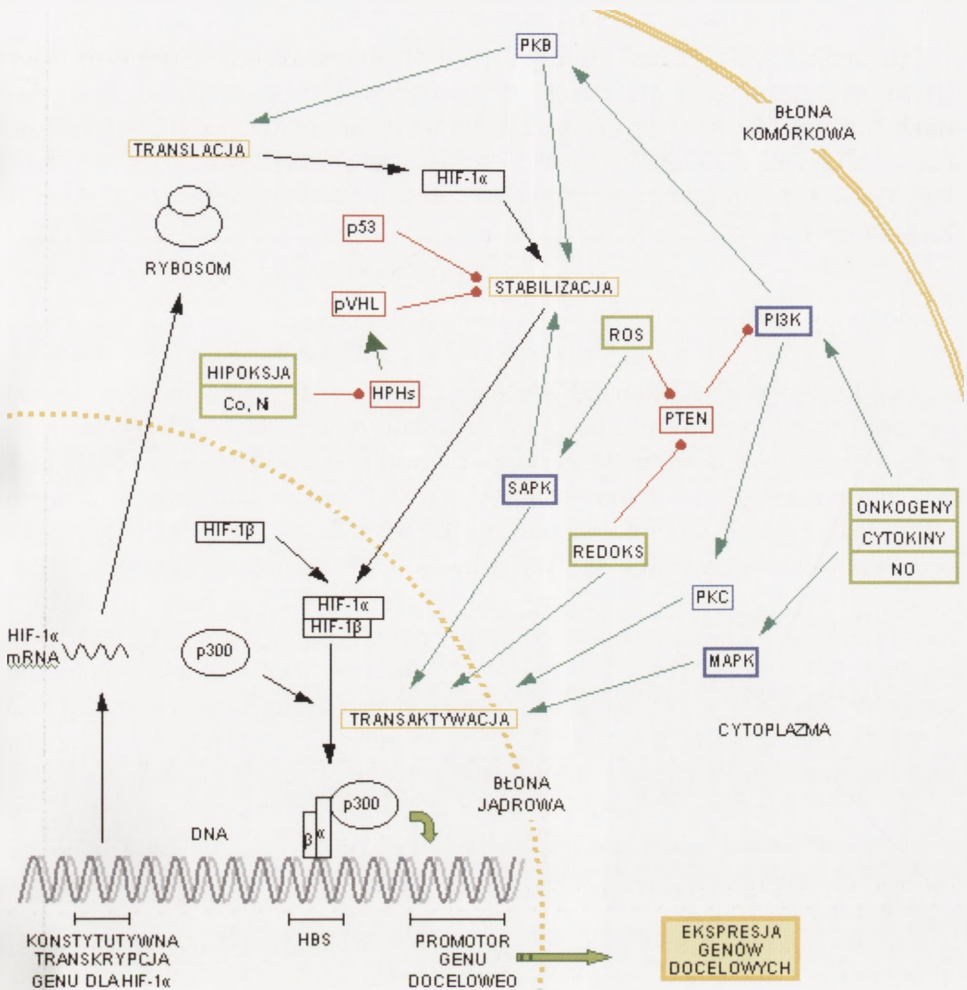
Ważną rolę w aktywacji genów regulowanych przez HIF-1 przypisuje się kofaktorowi transkrypcyjnemu CBP/p300, gdyż zaburzenia jego interakcji z HIF-1 α przyczyniają się do znacznego obniżenia zdolności transaktywacyjnej HIF-1 α . Zależna od HIF-1 ekspresja genów wymaga utworzenia wieloskładnikowego kompleksu pomiędzy nim a innymi czynnikami transkrypcyjnymi oraz kofaktorami. W promotorze genu dla dehydrogenazy mleczanowej-A istnieją dwa miejsca wiążące HIF. Dodatkowo promotor ten ma sekwencję CRE (ang. *cAMP response element*), wiążącą CREB-1/ATF-1 (ang. *cAMP response element binding protein-1/activating transcription factor-1*). CBP/p300 wiąże się zarówno z HIF-1, jak i z CREB-1. Słabe wiązanie może się wytworzyć już pomiędzy CBP/p300 a jednym z tych czynników, lecz wiązanie z wysokim powinowactwem wymaga obecności obydwu z nich [90]. HIF-1 α wiąże się także z innymi kofaktorami, takimi jak: SRC-1 (ang. *steroid receptor coactivator-1*) i TIF2 (ang. *transcription intermediary factor-2*), co zwiększa jego zdolność transaktywacyjną [12].

4.2. Mechanizmy regulujące działanie HIF-1 α

HIF-1 α wymaga wieloetapowej aktywacji w celu osiągnięcia pełnej zdolności transkrypcyjnej. Oprócz głównego mechanizmu tlenowego, regulującego ilość i aktywność komórkowej puli HIF-1 α , wiele innych regulatorów moduluje funkcję HIF-1 na rozmaitych poziomach jego aktywacji (ryc. 3).

4.2.1. Regulacja zależna od tlenu

Poza opisanym wcześniej mechanizmem regulacji stabilności HIF-1 α przez zależne od tlenu hydroksylazy prolinowe, wykryto także inne mechanizmy inaktywujące HIF-1 α w warunkach normoksji.



RYCINA 3. Wieloetapowa regulacja HIF-1α. Oprócz podstawowego mechanizmu tlenowego, regulującego funkcję HIF-1α, znane jest wiele innych jego regulatorów. Istotną rolę odgrywają geny supresorowe nowotworów, takie jak: pVHL, p53, PTEN, hamujące nadmierną aktywność HIF-1α. Wiele substancji (produkty onkogenów, cytokiny, tlenek azotu, wolne rodniki tlenowe) moduluje funkcję HIF-1α przez szlaki komórkowych kinaz białkowych, takich jak: PI3K czy MAPK. HIF-1α może także ulegać modyfikacjom redoks, zwiększającym jego zdolność do wiązania koaktywatorów transkrypcyjnych

W warunkach tlenowych dochodzi do acetylacji lizyny 532, leżącej w obrębie domeny ODD. Enzymem katalizującym tę reakcję jest acetylotransferaza ARD1. Reakcja ta umacnia wiązanie HIF-1α z pVHL, nasilając degradację HIF-1α w proteasomie. ARD1 acetyluje HIF-1α w warunkach normoksji, a efekt ten stopniowo ustępuje podczas przejścia do stanu hipoksji, co wskazuje na regulację tego procesu przez mechanizm tlenowy [37].

FIH-1 (ang. *factor inhibiting HIF-1*) został zidentyfikowany jako białko hamujące zdolność transaktywacyjną HIF-1α. Wiąże się on z domenami TAD-C oraz z fragmentem ID (wchodzącymi w skład HIF-1α), a także może wchodzić w interakcję z pVHL

tworząc razem z HIF-1 α i pVHL trójbiałkowy kompleks. Jego nadekspresja nawet w warunkach tlenowych hamuje zdolność transaktywacyjną HIF-1 α [54]. Badania nad modyfikacjami kowalencyjnymi, którym podlega domena TAD-C, wykazały, że w stanie normoksji hydroksylowana jest Asn 803, leżąca w jej obrębie. Okazało się, że hydroksylacja Asn 803 hamuje wiązanie p300/CBP z domeną TAD-C, a hipoksja i DMOG (dimetylolooksali glicyna), inhibitor kompetycyjny dioksygenaz, znoszą ten efekt [47]. Późniejsze badania wykazały, że to właśnie odkryty wcześniej FIH-1 jest dioksygenazą, katalizującą hydroksylację Asn 803 [46].

4.2.2. Geny supresorowe nowotworów

Jedną z najważniejszych barier chroniących nas przed nowotworami są wewnętrzne mechanizmy regulacyjne, w skład których wchodzi białka kodowane przez geny supresorowe nowotworów, zwane potocznie antyonkogenami. Modelowym przykładem jest p53, produkt genu *TP53*, białko będące kluczowym punktem w odpowiedzi komórki na stres, indukowany np. przez uszkodzenia DNA czy hipoksję i determinującym los komórki [82]. Wykazano zależność pomiędzy ekspresją HIF-1 α a p53 związaną zarówno z Mdm2 (ang. *mouse double minute-2*), jak i z p300 [15, 76]. Sanchez-Puig i współpracownicy wykazali niedawno udział domeny ODD HIF-1 α w bezpośrednim wiązaniu p53 [70]. Nie jest w pełni jasne, jakie są skutki biologiczne tej interakcji. Stabilizacja p53 następuje w warunkach głębokiej hipoksji (poniżej 1% O₂) oraz anoksji w odróżnieniu od HIF-1 α , którego ekspresja wzrasta również w warunkach łagodnej hipoksji. Wydaje się, że w stanie przedłużającej się hipoksji dochodzi do konkurencji pomiędzy p53 a HIF-1 α o wiązanie z p300. Wiążąc się z p300 p53 może osłabiać transdukcję sygnału przez HIF-1 α . Dalsze badania nad biologicznym znaczeniem interakcji pomiędzy p53 a HIF-1 α mogą mieć kluczowe znaczenie w terapii nowotworów [21].

Jak wspomniano wcześniej, pVHL reguluje poziom HIF-1 α , kierując go w warunkach normoksji na drogę ubikwityno-zależnej degradacji w proteasomie. Komórki niemające pVHL wykazują konstytutywną ekspresję HIF-1 α , natomiast przywrócenie jego ekspresji hamuje akumulację HIF-1 α w warunkach tlenowych [56,83].

PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) jest ważnym inhibitorem szlaku PI3K (patrz dalej). Badania na linii komórkowej U973 wykazały, że jego utrata wzmacnia ekspresję genów regulowanych przez HIF-1 α , a ekspresja hamuje stabilizujące działanie hipoksji na HIF-1 α w komórkach glejaka [98].

4.2.3. Onkogeny

W wielu komórkach nowotworowych dochodzi do aktywacji onkogenów odpowiedzialnych za ekspresję białek zaburzających fizjologiczną regulację procesów komórkowych. Modelowym przykładem jest aktywacja onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL, której konstytutywna aktywność charakterystyczna jest dla większości przypadków przewlekłej białaczki szpikowej. Udowodniono, że BCR/ABL przyczynia się do zwiększonej aktywności HIF-1 poprzez stymulujący wpływ na kaskadę kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase* – PI3K), która jest dodatnim regulatorem szlaku HIF-1 [57]. Podobny efekt na PI3K, a tym samym na HIF-1, wywiera

także ulegający nadekspresji w raku sutka onkogen HER2/neu [48]. Inne onkogeny (c-Src, H-Ras) mogą dodatkowo pobudzać szlak kinaz MAPK, kolejnych aktywatorów HIF-1 [14,39]. Poza aktywacją komórkowych szlaków przekazywania sygnałów wykazano także hamujący wpływ niektórych onkogenów na hydroksylację HIF-1 α , co przekłada się na jego stabilizację [13].

4.2.4. Czynniki wzrostu i inne cytokiny

Czynniki wzrostu są odpowiedzialne za parakrynnie i autokrynnie przekazywanie sygnałów między komórkami. Wiążąc się z receptorem powierzchniowym komórki, uruchamiają kaskadę kinaz, modulujących funkcję HIF-1 α . Cytokiny mogą pobudzać szlak PI3K [84, 95, 98] lub szlak kinaz MAPK [79]. Zidentyfikowano wiele czynników wzrostu regulujących HIF-1 α zarówno w czasie normoksji, jak i hipoksji m.in. EGF [95], IGF-1 [98], insulina [84], bFGF [79].

4.2.5. Wolne rodniki tlenowe

Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące produkcji wolnych rodników w komórkach poddanych hipoksji [93]. O ile kwestia produkcji reaktywnych form tlenu (*ang reactive oxygen species* – ROS) w tych warunkach pozostaje niewyjaśniona, wykazano ich rolę w regulacji aktywności szlaków przekazywania sygnałów komórkowych oraz związany z nią mechanizm modulacji funkcji szlaku HIF-1.

Z wolnych rodników aktywujących szlak HIF-1, najważniejszą rolę pełni nadtlenek wodoru. Zwiększona produkcja H₂O₂ w komórce wzmacnia aktywność transkrypcyjną genów regulowanych przez sekwencję HRE [28], poprzez utlenienie cysteiny leżącej w centrum aktywnym PTEN, powodując jego odwracalną inaktywację [50]. Do wytworzenia H₂O₂ dochodzi poprzez aktywację oksydazy NADPH, która utlenia O₂ do anionu ponadtlenkowego O₂⁻, przekształcanego następnie przez dysmutazę ponadtlenkową (*ang. superoxide dysmutase* – SOD) do H₂O₂. Badania przeprowadzone na komórkach mięśni gładkich ścian naczyń, stymulowanych przez trombinę i AngII, wykazały znaczącą rolę szlaku PI3K i kinazy p38, w indukowanej przez H₂O₂ ekspresji i stabilizacji HIF-1 α [25,65]. Podobny wpływ wywierają na HIF-1 α także wolne rodniki powstające podczas redukcji wanadu V(V) i chromu Cr(VI) [23, 24]. Również ROS wytwarzane przez bakterie *Helicobacter pylori* przyczyniają się do stabilizacji HIF-1 α , nawet w warunkach normoksji, co może tłumaczyć kancerogenny wpływ tego drobnoustroju na komórki błony śluzowej żołądka [66].

4.2.6. Tlenek azotu

Poziom komórkowy tlenku azotu w złożony sposób wpływa na ekspresję HIF-1 α . Akumulacja HIF-1 α , indukowana przez donory tlenku azotu (NO) lub ekspresję indukowanej syntazy tlenku azotu (*ang. inducible nitric oxide synthase* – iNOS), jest zależna od czasu i stężenia tlenku azotu. Mniejsze stężenia NO (100 μ M) okazują się szybciej indukować ekspresję HIF-1 α [71]. Tlenek azotu może funkcjonować jako przekaźnik sygnałów w cytoplazmie, aktywując szlaki komórkowych kinaz białkowych, które następnie zwiększają aktywność HIF-1 α [40,72]. Wykazano także jego inaktywujący wpływ na HPHs, prawdopodobnie w mechanizmie kompetycji NO o miejsce katalityczne tej grupy enzymów [58].

W stanie hipoksji NO wydaje się pełnić skrajnie odmienną funkcję. Jako inhibitor kompleksu IV łańcucha oddechowego hamuje zużycie tlenu w mitochondrium. Powoduje to udostępnienie tlenu dla innych enzymów, w tym 4-hydroksylaz prolinowych, które „nie zauważają hipoksji”, a tym samym kierują HIF-1 α na drogę degradacji [29].

4.2.7. Jony metali ciężkich

Związek między jonami metali ciężkich a HIF-1 został odkryty już na samym początku badań nad HIF-1, lecz mechanizm, w jakim działają one na ten czynnik transkrypcyjny, długo pozostawał niewyjaśniony. Przełomem było odkrycie 4-hydroksylaz modyfikujących HIF-1 α , będących długo poszukiwanymi detektorami poziomu tlenu w komórce. Przyjęła się wówczas proponowana już wcześniej teoria, zakładająca kompetycję Co(II) z Fe(II) o centrum aktywne 4-hydroksylaz prolinowych [9]. Później wykazano stymulację przez jony Ni(II) szlaku PI3K/Akt w komórkach C141 oraz wynikającą z niej HIF-zależną ekspresję NDRG1 (ang. *N-myc downstream-regulated gene*), co pokazało inne możliwe mechanizmy regulacji funkcji HIF-1 α przez jony metali ciężkich [51]. Ostatnie doniesienia proponują nowy pogląd na rolę Ni(II) i Co(II) w indukcji HIF-1 α . Okazało się, że jony te drastycznie obniżają komórkowy poziom kwasu askorbinowego. Jego funkcją jest redukcjonowanie jonu Fe(III) do jonu Fe(II) i utrzymywanie go w tym stanie, co zapewnia funkcjonowanie dioksygenaz. Degradując kwas askorbinowy, jony Ni(II) i Co(II) hamują funkcję 4-hydroksylaz prolinowych, a tym samym degradację HIF-1 α [69].

4.2.8. Modyfikacje redoks

Środowisko redukcyjne komórki wpływa na stabilizację HIF-1 α , jego zdolności do wiązania się z DNA oraz jego fosforylację. W warunkach tych nasila się także indukujące HIF-1 α działanie kobaltu [63]. Ekspresja białek redukcyjnych, takich jak: tioredoksyna (Trx-1) czy Ref-1 (ang. *redox factor-1*), przyczynia się do redukcji aminokwasów cysteinowych w obrębie domeny TAD-C HIF-1 α , co ułatwia jej wiązanie z CBP i SRC-1, skutkując aktywacją obydwu domen TAD [12,93]. Transfekcja różnych linii komórek nowotworowych (MCF-7, HT-29, WEHI7.2) genem dla Trx-1, spowodowała wzrost ekspresji HIF-1 α oraz jeszcze wyraźniejszy wzrost jego aktywności transkrypcyjnej, co potwierdza zwiększenie jego zdolności transaktywacyjnej [88]. PX-12 i pleurotyna, inhibitory Trx-1, obniżają poziom ekspresji HIF-1 α , jego zdolność transaktywacyjną oraz ekspresję VEGF w komórkach MCF-7 i HT-29, co potwierdza znaczenie modyfikacji redoks w procesie aktywacji HIF-1 α [89].

4.2.9. Inne regulatory

Jony Ca²⁺ także modulują stabilność HIF-1 α . BAPTA – chelator Ca²⁺ zmniejsza jego dostępność w komórce, co w warunkach normoksji stabilizuje HIF-1 α przez hamowanie funkcji PHD2. Efekt ten jest hamowany przez dodanie Ca²⁺, co wskazuje na jego rolę w tym procesie. W przebiegu hipoksji komórkowy Ca²⁺ gromadzi się stopniowo w jądrze, hipotetycznie hamując działanie zależnej od niego, a zlokalizowanej w cytozolu PHD2, czego skutkiem jest stabilizacja HIF-1 α . Ponadto BAPTA zwiększa aktywność transkrypcyjną HIF-1, działając na domenę TAD-C. Prawdopodobnie reguluje on

aktywność FIH-1 w sposób podobny do regulacji PHD2. W ten sposób może być on traktowany jako ekwiwalent stanu hipoksji [6].

Ostatnie doniesienia wskazują na istotną rolę sierociego receptora jądrowego Nur77 (ang. *orphan nuclear receptor-77*) w regulacji funkcji HIF-1 α . Stabilizuje on HIF-1 α poprzez obniżenie ekspresji MDM2 za pomocą swojej N-końcowej domeny transaktywacyjnej. Co ciekawe, proces ten zależy od fosforylacji p42/p44 MAPK przez Nur77, a PD98059 (inhibitor MEK) hamuje fosforylację oraz akumulację HIF-1 α . Nur77 wzmacnia aktywność transkrypcyjną HIF-1 nawet w stanie normoksji [92].

Kinaza białkowa zależna od DNA (DNA-PK), odpowiedzialna za naprawę złamań podwójnej nici DNA także wydaje się wpływać na ekspresję HIF-1 α najprawdopodobniej poprzez fosforylację i wynikającą z niej stabilizację HIF-1 α [85].

5. SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW REGULUJĄCE HIF-1

Odpowiedź komórkowa na działanie rozmaitych bodźców zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych jest skomplikowanym procesem, na który składa się odbiór bodźca przez odpowiednie receptory, jego przetworzenie oraz przesłanie informacji do jądra komórkowego, w celu wywołania odpowiedniej reakcji na działający bodziec. Sygnały docierające do jądra komórkowego są przewodzone głównie poprzez szlaki kinaz białkowych, aktywujące odpowiednie czynniki transkrypcyjne, inicjujące następnie odpowiedź komórki na działające bodźce. Bardzo istotnym zagadnieniem jest wyjaśnienie roli tych szlaków w regulacji funkcji HIF-1, co umożliwi dalsze zrozumienie wpływu niektórych czynników na aktywność szlaku HIF-1.

5.1. Szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K)

PI3K katalizuje reakcję fosforylacji difosforanu do trifosforanu fosfatydyloinozytolu, który następnie aktywuje kinazy białkowe, katalizujące fosforylację białek odpowiedzialnych za wyzwolenie reakcji komórkowej, odpowiedniej do działającego na komórkę bodźca. Głównymi białkami przewodzącymi sygnały w tym szlaku są dwie kinazy białkowe: PKB i PKC [10].

5.1.1. Kinaza białkowa B (PKB)

PKB, także znana jako Akt, zwiększa ekspresję HIF-1 α , lecz nie w wyniku bezpośredniej fosforylacji [98], ale poprzez zwiększenie ekspresji HIF-1 α na poziomie posttranskrypcyjnym [38], modyfikując funkcje białek bezpośrednio wiążących się z ekspresją HIF-1 α .

Akt może fosforylować białka, takie jak: mTOR (ang. *mammalian target of Rapamycin*) [84,95], p70S6K (ang. *ribosomal protein S6 kinase*) czy HDM2 (ang. *human double minute-2*) [80], zwiększające ekspresję HIF-1 α , poprzez nasilenie jego translacji.

Akt poza zwiększeniem ekspresji HIF-1 α poprzez stymulację translacji jego mRNA może wpływać również na jego stabilizację. Poprzez fosforylację 3-kinazy syntazy glikogenu (ang. *glycogen synthase kinase-3 β -GSK3 β*) hamuje jej destabilizujący wpływ

na HIF-1 α [62]. Akt zwiększa także ekspresję białek szoku cieplnego Hsp70 i Hsp90, chroniących HIF-1 α przed degradacją niezależną od pVHL [97].

5.1.2. Kinaza białkowa C (PKC)

Pojawiają się coraz to nowe dowody przemawiające za istotną rolą PKC w regulacji funkcji HIF-1 α . Wydaje się, że jest ona enzymem pełniącym centralną funkcję w indukcji HIF-1 α , w stymulowanych przez angiotensynę II komórkach mięśni gładkich ścian naczyń – VSMC. Wykazano, że zwiększa ona poziom ekspresji HIF-1 α , najpierw zwiększając ilość jego mRNA, a następnie nasilając jego translację [65].

Dla jednej z form PKC – PKC ξ , udowodniono, że może obniżać poziom HIF-1 mRNA w liniach komórkowych raka jasnokomórkowego nerki (RCC). Mechanizm ten może tłumaczyć zdolność HIF-1 α do wiązania CBP/p300 w warunkach tlenowych [20].

5.2. Szlak kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK)

Do tej pory odkryto trzy główne rodziny kinaz aktywowanych mitogenami (MAP): klasyczną MAP (także zwaną ERK – *extracellular signal regulated protein kinase*), oraz dwie rodziny kinaz aktywowanych przez stres (ang. *stress activated protein kinases*): JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) i p38 [94]. Również i ten szlak odgrywa istotną rolę w regulacji funkcji HIF-1 α .

5.2.1. Kinaza białkowa aktywowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ERK)

Istnieją dwie koncepcje dotyczące aktywacji HIF-1 α poprzez p42/44 (Erk). Niezależnie od zaproponowanego mechanizmu, pobudzenie szlaku MEK1/p42/p44 przyczynia się do aktywacji domen TAD w obrębie HIF-1 α i zwiększenia jego aktywności transkrypcyjnej [49]. Pierwsza teoria zakłada, że MAPK przyczynia się do fosforylacji HIF-1 α w warunkach, zarówno normoksji jak i hipoksji, przez co zwiększa jego aktywność transkrypcyjną [67,81]. Badania wykazały, że w komórkach HMEC-1, ERK1 jest potrzebny do aktywacji transkrypcyjnej HIF-1 α przez jego bezpośrednią fosforylację podczas hipoksji [60]. Inna hipoteza mówi, że MAPK nie fosforyluje HIF-1 α , lecz wpływa na zdolność transaktywacyjną CBP/p300 i na jego zdolność wiązania się z HIF-1 α . Według tego modelu eksperymentalnego, MAPK albo bezpośrednio fosforyluje CBP, albo modyfikuje inne białka wchodzące w interakcję z p300 [73].

5.2.2. Kinazy białkowe aktywowane stresem (SAPK)

Szlak kinaz aktywowanych stresem odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji HIF-1 α i VEGF w komórkach raka kolczystokomórkowego (ang. *squamous cell carcinoma* – SCC) głowy i szyi. Hipoksja okazała się aktywować JNK1 i p38, a nadekspresja już jednego z nich jest wystarczająca do indukcji HIF-1 α i VEGF w komórkach SCC [78].

Czynnik transkrypcyjny c-JUN, regulowany przez JNK, wydaje się współpracować z HIF-1 α . Mutacje w obrębie c-JUN, jak i inhibitory JNK, częściowo osłabiały aktywność transkrypcyjną HIF-1 α . Co ciekawe, poziom ekspresji HIF-1 α nie uległ zmianie, a c-JUN nie musi bezpośrednio wiązać się z DNA w celu aktywacji HIF-1 α [3]. Ostatnie badania wskazują także na istotną rolę JNK w indukowanej przez hipoksję, HIF-1-zależnej transkrypcji MDR1 (ang. *multidrug resistance gene*) [18].

p38 może bezpośrednio fosforylować HIF-1 α w obrębie domeny ID i wzmacniać jego aktywność transkrypcyjną [81]. p38 może być aktywowane poprzez powstające w mitochondrium wolne rodniki. Do ich tworzenia dochodzi np. podczas redukcji Cr(VI) do Cr(V). Powstające ROS przyczyniają się do stabilizacji HIF-1 α , aktywując p38 [24].

6. GENY DOCELOWE

Dotychczas zidentyfikowano kilkadziesiąt genów regulowanych przez HIF-1, a ich liczba stale się powiększa. HIF-1 jest odpowiedzialny za adaptację komórek do stanu hipoksji, w związku z czym geny uruchamiane przez HIF-1 odpowiedzialne będą głównie

TABELA 1. Niektóre geny aktywowane przez HIF-1*

Proces adaptacyjny/kompensacyjny		Produkt genu
1. Przywrócenie optymalnej dostawy tlenu	A. Angiogeneza	VEGF VEGFR-1
	B. Napięcie ściany naczyń	iNOS ET-1 Adrenomedullina
	C. Erytropoeza	EPO
	D. Transport żelaza	Transferyna Ceruloplazmina
2. Adaptacja do metabolizmu beztlenowego	A. Enzymy glikolityczne	Wszystkie enzymy cyklu glikolitycznego
	B. Transportery glukozy	GLUT-1 GLUT-3
	C. Regulacja pH	CAIX
3. Przeżycie komórek w stanie hipoksji	A. Czynniki wzrostu	IGF-2 TGF- α
	B. Hamowanie apoptozy	NPM
4. Inne	A. Hamowanie różnicowania	ID2
	B. Odporność na chemioterapeutyki	P-gp
	C. Metabolizm macierzy zewnątrzkomórkowej	MMP2 Katesyna D

*HIF-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez hipoksję, umożliwiającym komórkom dostosowanie się do środowiska zmniejszonej dostępności tlenu. Przywraca on optymalną dostawę tlenu, ułatwia komórkom adaptację do stanu hipoksji, chroni je przed apoptozą, a także pełni wiele innych ważnych funkcji

za poprawę dostawy tlenu, przestawienie metabolizmu na proces beztlenowy oraz hamowanie apoptozy komórek (tab. 1).

Do pierwszej grupy należą substancję odpowiedzialne za tworzenie nowych naczyń (VEGF, VEGFR-1), regulację napięcia ściany naczyń (iNOS, endotelina-1, adrenomedullina) oraz za erytropoezę (EPO) i transport żelaza (transferyna, ceruloplazmina).

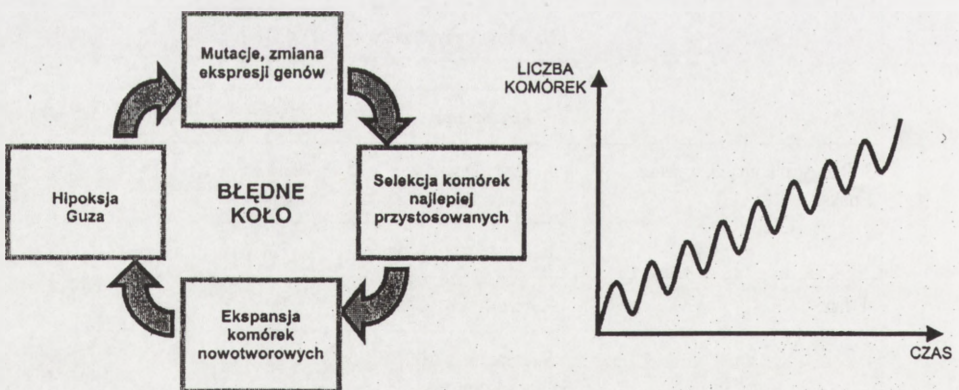
Drugą grupę stanowią enzymy glikolityczne, transportery glukozy (GLUT-1, GLUT-3) oraz regulująca pH komórki anhidraza węglanowa (CAIX).

W trzeciej kategorii można znaleźć czynniki wzrostu (insulino-podobny czynnik wzrostu – IGF-2, transformujący czynnik wzrostu – TGF- α), oraz białka hamujące apoptozę indukowaną przez hipoksję (nukleofosmina – NPM).

Z punktu widzenia komórek nowotworowych ważnymi substancjami indukowanymi przez HIF-1 są także enzymy trawiące macierz zewnątrzkomórkową, białka hamujące różnicowanie (ID2) oraz P-gp, odpowiedzialna za odporność na niektóre chemioterapeutyki.

7. ROLA W PROGRESJI NOWOTWORÓW

Hipoksja charakteryzuje guzy lite. Przyczyniają się do niej, między innymi, zaburzenia w liczbie, budowie i funkcji naczyń guza, duże odległości między komórkami nowotworowymi a światłem naczyń oraz indukowana przez proces nowotworowy lub wdrożoną chemoterapię niedokrwistość [87]. Te wszystkie czynniki przyczyniają się do pogorszenia dostawy tlenu do komórek nowotworowych, co skutkuje selekcją komórek opornych na apoptozę, zdolnych do podziałów, modyfikujących swój metabolizm oraz stymulujących angiogenezę. Te wyselekcjonowane komórki, mnożąc się, pogłębiają stan hipoksji, co zamyka i nakręca błędne koło chorobowe (ryc. 4) [86]. Mechanizm indukowania



RYCINA 4. Błędne koło chorobowe, napędzane przez hipoksję. Nadmiernie mnożące się komórki nowotworowe znajdują się w stanie hipoksji. Stymuluje ona powstawanie mutacji, które umożliwiają lepsze przystosowanie się komórek do trudnych warunków, w których przebywają. W efekcie duża część z nich ulega apoptozie lub nekrozie, a selekcji ulegają tylko te, które uległy mutacjom, umożliwiającym im przeżycie. Rozrost tych komórek pogłębia stan hipoksji i stymuluje dalsze mutacje, zmierzając ku powstaniu klonów doskonale przystosowanych do przetrwania w organizmie w stanie hipoksji. Dynamikę wzrostu guza można przedstawić jako sinusoidę, stopniowo zmierzającą ku górze

wanych przez hipoksję mutacji długo pozostawał niewyjaśniony. Ostatnie doniesienia sugerują, że HIF-1 α może w istotny sposób przyczynić się do niestabilności genetycznej komórek nowotworowych, poprzez hamowanie ekspresji kompleksu rozpoznającego błędnie sparowane zasady – MutS α (MSH2-MSH6). Co ciekawe obecność p53 wydaje się być konieczna w tym procesie, co pozwala przypuszczać, że HIF-1 α przyczynia się do powstania mutacji genomu we wczesnych etapach rozwoju nowotworu, gdyż większość złośliwych nowotworów traci ekspresję dzikiego p53 [42].

Ekspresja HIF-1 α odzwierciedla stan niedotlenienia komórki, a jego zwiększoną ekspresję wykazano w przypadku większości nowotworów, ich przerzutów oraz niektórych zmianach przednowotworowych [96]. Poza hipoksją, jego nadekspresja związana jest z nagromadzeniem się mutacji genów supresorowych nowotworów, takich jak: PTEN [98], pVHL [91] i p53 [75], oraz aktywacją onkogenów m.in. Ras [14], HER2/neu [48] i Src [39]. Stale aktywny szlak HIF-1 umożliwia komórkom nowotworowym lepszą i szybszą adaptację do ciężkich warunków, w których się znajdują, a już niewielka ilość komórek wykazujących nadekspresję HIF-1 α jest w stanie przyspieszyć wzrost całego guza [31], co sprawia, że jego nadekspresję wiąże się z niekorzystnym rokowaniem terapii przeciwnowotworowych [7,33] (ryc. 5).

HIF-1 α w znacznym stopniu przyczynia się do stymulacji angiogenezy nowotworowej. Indukuje transkrypcję genu dla VEGF, który jest najważniejszym czynnikiem regulującym powstawanie nowych naczyń [22]. Ekspresja VEGF w komórkach nowotworowych pełni kluczową rolę we wzroście guza oraz utrzymaniu prawidłowej funkcji naczyń krwionośnych [27]. Innym czynnikiem angiogenym indukowanym przez HIF-1 α jest Cyr61 (ang. *cysteine rich protein-61*), którego ekspresję zaobserwowano w komórkach czerniaka. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że sama obecność, a nie wiązanie HIF-1 z DNA jest wystarczająca do indukcji Cyr61, co wskazuje na to, że HIF-1 pełni istotną funkcję nie tylko na poziomie wiązania z HRE [45]. Stymulacja angiogenezy wiąże się ze zwiększeniem ryzyka powstawania przerzutów, gdyż komórki nowotworowe mają większą szansę na przedostanie się do układu krążenia [11].

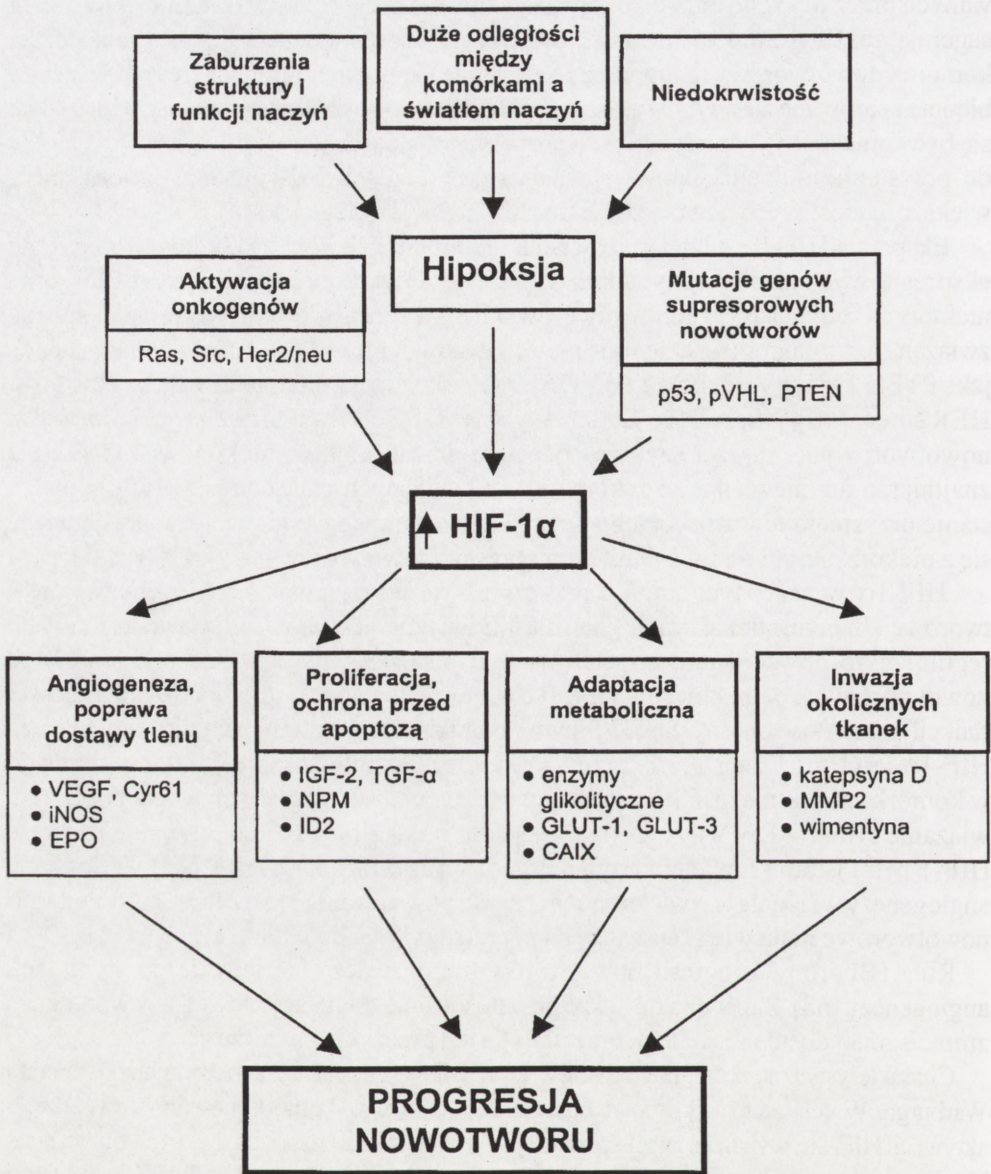
Rola HIF-1 α w progresji nowotworów nie ogranicza się jedynie do stymulacji angiogenezy [68]. Zapewnia on także przystosowanie do funkcjonowania w warunkach zmniejszonej dostępności tlenu oraz ułatwia ich przeżycie i rozprzestrzenianie.

Charakterystyczną cechą nowotworów jest nasilona glikoliza, zjawisko znane jako efekt Warburga. W celu adaptacji do metabolizmu beztlenowego, komórki nowotworowe, dzięki aktywacji HIF-1 α , wykazują zwiększoną ekspresję wszystkich enzymów cyklu glikolitycznego [4]. Dodatkowo HIF-1 α pobudza ekspresję transporterów glukozy oraz CAIX, regulującej poziom pH komórki, zapewniając optymalne dostosowanie do takiej zmiany w metabolizmie.

HIF-1 α jest także w stanie hamować indukowaną przez hipoksję śmierć komórki.

W różnych nowotworach zaobserwowano korelację pomiędzy ekspresją HIF-1 α a spadkiem podatności na apoptozę stymulowaną hipoksją bądź też pozbawieniem substancji odżywczych [2,17]. Okazało się, że HIF-1 α indukuje ekspresję NPM hamującego indukowaną przez hipoksję fosforylację p53 na Ser-15 [52].

Zwiększa on także szybkość proliferacji komórek poprzez indukcję białek ID (ang. *inhibitor of differentiation*) odpowiedzialnych za hamowanie różnicowania komórkowego. Powoduje to ekspansję komórek mniej zróżnicowanych, o wyższym potencjale



RYCINA 5. Rola HIF-1 α w progresji nowotworów. HIF-1 α ulega stałej nadekspresji w komórkach nowotworowych. Przyczynia się do tego stale towarzysząca im hipoksja, a także mutacje genów supresorowych nowotworów oraz aktywacja onkogenów. HIF-1 α odpowiedzialny jest za pobudzenie angiogenezy, adaptację do metabolizmu beztlenowego oraz ochronę komórek przed apoptozą. Dodatkowo ułatwia on naciekanie okolicznych tkanek, poprzez aktywację odpowiednich białek. Te wszystkie czynniki świadczą o tym, jak istotny jest HIF-1 α w progresji nowotworów

mitotycznym [53], których rozprzestrzenianie dodatkowo ułatwione jest przez zwiększenie ekspresji enzymów trawiących macierz zewnątrzkomórkową [44].

Nadekspresja HIF-1 α często wiąże się także z opornością nowotworów na niektóre rutynowo stosowane terapie, takie jak: radioterapia [1], terapia fotodynamiczna [43] czy chemioterapia [19].

Pomimo wielu dowodów przemawiających za istotną funkcją, którą pełni HIF-1 w biologii nowotworów, opublikowano także przypadki paradoksalnie zwolnionego rozwoju nowotworu w warunkach nadekspresji HIF-1 α [74]. Niejasna jest także do końca jego rola w regulacji procesu apoptozy [26]. O ile dobrze poznano mechanizmy regulujące HIF-1 w warunkach fizjologicznych, jego funkcjonowanie w warunkach patologicznych (np. nowotworach) nadal pozostawia wiele niejasności. Niedawno opublikowane badania wskazują istnienie kompensacyjnych szlaków aktywacji angiogenezy, umożliwiające wytworzenie naczyń guza, nawet w przypadku braku ekspresji HIF-1 α w jego komórkach. Istotną rolę w tych procesach przypisuje się interleukinie-8 (IL-8) – jednemu z głównych czynników angiogennych (poza VEGF), wytwarzanych przez niektóre nowotwory [61]. Pomimo pojawiających się kontrowersji i sprzecznych doniesień, dotyczących roli HIF-1 α w biologii nowotworów, jest on bardzo atrakcyjnym celem dla terapii przeciwnowotworowych [8], a lepsze zrozumienie jego funkcji w fizjologii i patologii ma szansę pomóc w walce z nowotworami.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AEBERSOLD DM, BURRI P, BEER KT, LAISSUE J, DJONOV V, GREINER RH, SEMENZA GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 2911–2916.
- [2] AKAKURA N, KOBAYASHI M, HORIUCHI I, SUZUKI A, WANG J, CHEN J, NIIZEKI H, KAWAMURA K, HOSOKAWA M, ASAKA M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 2001; **61**: 6548–6554.
- [3] ALFRANCA A, GUTIERREZ MD, VARA A, ARAGONES J, VIDAL F, LANDAZURI MO. c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 12–22.
- [4] ALTENBERG B, GREULICH KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 2004; **84**: 1014–1020.
- [5] BAE MK, AHN MY, JEONG JW, BAE MH, LEE YM, BAE SK, PARK JW, KIM KR, KIM KW. Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9–12.
- [6] BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, PETRAT F, DOEGE K, TRINIDAD B, FREITAG P, METZENE, DE GROTH H, FANDREY J. Chelation of cellular calcium modulates hypoxia-inducible gene expression through activation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2004; **279**: 44976–44986.
- [7] BIRNER P, SCHINDL M, OBERMAIR A, PLANK C, BREITENECKER G, OBERHUBER G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 4693–4696.
- [8] BROWN JM, WILSON WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 437–447.
- [9] BRUICK RK, MCKNIGHT SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001; **294**: 1337–1340.
- [10] CANTRELL DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 2001; **114**: 1439–1445.
- [11] CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**: 249–257.

- [13] CHAN DA, SUTPHIN PD, DENKO NC, GIACCIA AJ. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2002; **277**: 40112–40117.
- [14] CHEN C, POREN N, BEHROOZ A, ISMAIL-BEIGI F, MAITY A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; **276**: 9519–9525.
- [15] CHEN D, LI M, LUO J, GU W. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 2003; **278**: 13595–13598.
- [16] CHUN YS, KIM MS, PARK JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci* 2002; **17**: 581–588.
- [17] CHUNG J, YOON S, DATTA K, BACHELDER RE, MERCURIO AM. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor transcription and protection from apoptosis are dependent on alpha6beta1 integrin in breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 4711–4716.
- [18] COMERFORD KM, CUMMINS EP, TAYLOR CT. c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent P-glycoprotein expression in hypoxia. *Cancer Res* 2004; **64**: 9057–9061.
- [19] COMERFORD KM, WALLACE TJ, KARHAUSEN J, LOUIS NA, MONTALTO MC, COLGAN SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002; **62**: 3387–3394.
- [20] DATTA K, LI J, BHATTACHARYA R, GASPARIAN L, WANG E, MUKHOPADHYAY D. Protein kinase C zeta transactivates hypoxia-inducible factor alpha by promoting its association with p300 in renal cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 456–462.
- [21] FELSDR, KOUMENIS C. HIF-1alpha and p53: the ODD couple? *Trends Biochem Sci* 2005; **30**: 426–429.
- [22] FORSYTHE JA, JIANG BH, IYER NV, AGANI F, LEUNG SW, KOOS RD, SEMENZA GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 4604–4613.
- [23] GAO N, DING M, ZHENG JZ, ZHANG Z, LEONARD SS, LIU KJ, SHI X, JIANG BH. Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31963–31971.
- [24] GAO N, JIANG BH, LEONARD SS, CORUM L, ZHANG Z, ROBERTS JR, ANTONINI J, ZHENG JZ, FLYNN DC, CASTRANOVA V, SHI X. p38 Signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 45041–45048.
- [25] GORLACH A, DIEBOLD I, SCHINI-KERTH VB, BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, ROTH U, BRANDES RP, KIETZMANN T, BUSSE R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; **89**: 47–54.
- [26] GREIJER AE, VAN DER WALL E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004; **57**: 1009–1014.
- [27] GRUNSTEIN J, ROBERTS WG, MATHIEU-COSTELLO O, HANAHAN D, JOHNSON RS. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res* 1999; **59**: 1592–1598.
- [28] GRZENKOWICZ-WYDRA J, CISOWSKI J, NAKONIECZNA J, ZAREBSKI A, UDILOVA N, NOHL H, JOZKOWICZ A, PODHAJSKA A, DULAK J. Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell Biochem* 2004; **264**: 169–181.
- [29] HAGEN T, TAYLOR CT, LAM F, MONCADA S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* 2003; **302**: 1975–1978.
- [30] HOFER T, DESBAILLETS I, HOPFL G, GASSMANN M, WENGER RH. Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy. *Faseb J* 2001; **15**: 2715–2717.
- [31] HOPFL G, WENGER RH, ZIEGLER U, STALLMACH T, GARDELLE O, ACHERMANN R, WERGIN M, KASER-HOTZ B, SAUNDERS HM, WILLIAMS KJ, STRATFORD IJ, GASSMANN M, DESBAILLETS I. Rescue of hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient tumor growth by wild-type cells is independent of vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2002; **62**: 2962–2970.
- [32] HUANG LE, GU J, SCHAU M, BUNN HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7987–7992.

- [33] HUI EP, CHAN AT, PEZZELLA F, TURLEY H, TO KF, POON TC, ZEE B, MO F, TEO PM, HUANG DP, GATTER KC, JOHNSON PJ, HARRIS AL. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 2595–2604.
- [34] ISAACS JS, JUNG YJ, MIMNAUGH EG, MARTINEZ A, CUTTITTA F, NECKERS LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 29936–29944.
- [35] ISAACS JS, JUNG YJ, NECKERS L. Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) promotes oxygen-independent stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulating an Hsp90-dependent regulatory pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**: 16128–16135.
- [36] JAAKKOLA P, MOLE DR, TIAN YM, WILSON MI, GIELBERT J, GASKELL SJ, KRIEGSHEIM A, HEBESTREIT HF, MUKHERJI M, SCHOFIELD CJ, MAXWELL PH, PUGH CW, RATCLIFFE PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; **292**: 468–472.
- [37] JEONG JW, BAE MK, AHN MY, KIM SH, SOHN TK, BAE MH, YOO MA, SONG EJ, LEE KJ, KIM KW. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; **111**: 709–720.
- [38] JIANG BH, JIANG G, ZHENG JZ, LU Z, HUNTER T, VOGT PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; **12**: 363–369.
- [39] KARNI R, DOR Y, KESHET E, MEYUHAS O, LEVITZKI A. Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression under normoxia. *J Biol Chem* 2002; **277**: 42919–42925.
- [40] KASUNO K, TAKABUCHI S, FUKUDA K, KIZAKA-KONDOH S, YODOI J, ADACHI T, SEMENZA GL, HIROTA K. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 2550–2558.
- [41] KIMURA H, WEISZ A, OGURA T, HITOMI Y, KURASHIMA Y, HASHIMOTO K, D'ACQUISTO F, MAKUUCHI M, ESUMI H. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 2001; **276**: 2292–2298.
- [42] KOSHIJI M, TO KK, HAMMER S, KUMAMOTO K, HARRIS AL, MODRICH P, HUANG LE. HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Mol Cell* 2005; **17**: 793–803.
- [43] KOUKOURAKIS MI, GIATROMANOLAKI A, SKARLATOS J, CORTI L, BLANDAMURA S, PIAZZA M, GATTER KC, HARRIS AL. Hypoxia inducible factor (HIF-1 α and HIF-2 α) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001; **61**: 1830–1832.
- [44] KRISHNAMACHARY B, BERG-DIXON S, KELLY B, AGANI F, FELDSER D, FERREIRA G, IYER N, LARUSCH J, PAK B, TAGHAVI P, SEMENZA GL. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003; **63**: 1138–1143.
- [45] KUNZ M, MOELLER S, KOZAN D, LORENZ P, WENGER RH, THIESEN HJ, GROSS G, IBRAHIM SM. Mechanisms of hypoxia gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 45651–45660.
- [46] LANDO D, PEET DJ, GORMAN JJ, WHELAN DA, WHITELAW ML, BRUICK RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; **16**: 1466–1471.
- [47] LANDO D, PEET DJ, WHELAN DA, GORMAN JJ, WHITELAW ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; **295**: 858–861.
- [48] LAUGHNER E, TAGHAVI P, CHILES K, MAHON PC, SEMENZA GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 3995–4004.
- [49] LEE E, YIM S, LEE SK, PARK H. Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1alpha regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol Cells* 2002; **14**: 9–15.
- [50] LEE SR, YANG KS, KWON J, LEE C, JEONG W, RHEE SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* 2002; **277**: 20336–20342.
- [51] LI J, DAVIDSON G, HUANG Y, JIANG BH, SHI X, COSTA M, HUANG C. Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-dependent, p70(S6k)-independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal Cl41 cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 94–101.
- [52] LI J, ZHANG X, SEJAS DP, BAGBY GC, PANG Q. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem* 2004; **279**: 41275–41279.

- [53] LOFSTEDT T, JOGI A, SIGVARDSSON M, GRADIN K, POELLINGER L, PAHLMAN S, AXELSON H. Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 39223–39231.
- [54] MAHON PC, HIROTA K, SEMENZA GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; **15**: 2675–2686.
- [55] MASSON N, WILLAM C, MAXWELL PH, PUGH CW, RATCLIFFE PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J* 2001; **20**: 5197–5206.
- [56] MAXWELL PH, WIESENER MS, CHANG GW, CLIFFORD SC, VAUX EC, COCKMAN ME, WYKOFF CC, PUGH CW, MAHER ER, RATCLIFFE PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; **399**: 271–275.
- [57] MAYERHOFER M, VALENT P, SPERR WR, GRIFFIN JD, SILLABER C. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood* 2002; **100**: 3767–3775.
- [58] METZEN E, ZHOU J, JELKMANN W, FANDREY J, BRUNE B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 3470–3481.
- [59] MIN JH, YANG H, IVAN M, GERTLER F, KAELIN WG, JR., PAVLETICH NP. Structure of an HIF-1alpha-pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002; **296**: 1886–1889.
- [60] MINET E, ARNOULD T, MICHEL G, ROLAND I, MOTTET D, RAES M, REMACLE J, MICHIELS C. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 2000; **468**: 53–58.
- [61] MIZUKAMI Y, JO WS, DUERR EM, GALA M, LI J, ZHANG X, ZIMMER MA, ILIOPOULOS O, ZUKERBERG LR, KOHGO Y, LYNCH MP, RUEDA BR, CHUNG DC. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med* 2005; **11**: 992–997.
- [62] MOTTET D, DUMONT V, DECCACHE Y, DEMAZY C, NINANE N, RAES M, MICHIELS C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 31277–31285.
- [63] NIKINMAA M, PURSIHEIMO S, SOITAMO AJ. Redox state regulates HIF-1alpha and its DNA binding and phosphorylation in salmonid cells. *J Cell Sci* 2004; **117**: 3201–3206.
- [64] OEHME F, ELLINGHAUS P, KOLKHOF P, SMITH TJ, RAMAKRISHNAN S, HUTTER J, SCHRAMM M, FLAMME I. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **296**: 343–349.
- [65] PAGE EL, ROBITAILLE GA, POUYSSEUR J, RICHARD DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; **277**: 48403–48409.
- [66] PARK JH, KIM TY, JONG HS, CHUN YS, PARK JW, LEE CT, JUNG HC, KIM NK, BANG YJ. Gastric epithelial reactive oxygen species prevent normoxic degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 433–440.
- [67] RICHARD DE, BERRA E, GOTHIE E, ROUX D, POUYSSEUR J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32631–32637.
- [68] RYAN HE, POLONI M, MCNULTY W, ELSON D, GASSMANN M, ARBEIT JM, JOHNSON RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; **60**: 4010–4015.
- [69] SALNIKOW K, DONALD SP, BRUICK RK, ZHITKOVICH A, PHANG JM, KASPRZAK KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* 2004; **279**: 40337–40344.
- [70] SANCHEZ-PUIG N, VEPRINTSEV DB, FERSHT AR. Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53. *Mol Cell* 2005; **17**: 11–21.
- [71] SANDAU KB, FANDREY J, BRUNE B. Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide. *Blood* 2001; **97**: 1009–1015.
- [72] SANDAU KB, ZHOU J, KIETZMANN T, BRUNE B. Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem* 2001; **276**: 39805–39811.
- [73] SANG N, STIEHL DP, BOHENSKY J, LESHCHINSKY I, SRINIVAS V, CARO J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 2003; **278**: 14013–14019.

- [74] SAVAÏ R, SCHERMULY RT, VOSWINCKEL R, RENIGUNTA A, REICHMANN B, EUL B, GRIMMINGER F, SEEGER W, ROSE F, HANZE J. HIF-1 α attenuates tumor growth in spite of augmented vascularization in an A549 adenocarcinoma mouse model. *Int J Oncol* 2005; **27**: 393–400.
- [75] SCHMID T, ZHOU J, BRUNE B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* 2004; **8**: 423–431.
- [76] SCHMID T, ZHOU J, KOHL R, BRUNE B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J* 2004; **380**: 289–295.
- [77] SEMENZA GL, WANG GL. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 5447–5454.
- [78] SHEMIRANI B, CROWE DL. Hypoxic induction of HIF-1 α and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma lines is mediated by stress activated protein kinases. *Oral Oncol* 2002; **38**: 251–257.
- [79] SHI YH, WANG YX, BINGLE L, GONG LH, HENG WJ, LI Y, FANG WG. *In vitro* study of HIF-1 activation and VEGF release by bFGF in the T47D breast cancer cell line under normoxic conditions: involvement of PI-3K/Akt and MEK1/ERK pathways. *J Pathol* 2005; **205**: 530–536.
- [80] SKINNER HD, ZHENG JZ, FANG J, AGANI F, JIANG BH. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 α , HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 45643–45651.
- [81] SODHI A, MONTANER S, PATEL V, ZOHAR M, BAIS C, MESRI EA, GUTKIND JS. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res* 2000; **60**: 4873–4880.
- [82] STOKLOSA T, GOLAB J. Prospects for p53-based cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 2005; **52**: 321–328.
- [83] TANIMOTO K, MAKINO Y, PEREIRA T, POELLINGER L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J* 2000; **19**: 4298–4309.
- [84] TREINS C, GIORGETTI-PERALDI S, MURDACA J, SEMENZA GL, VAN OBBERGHEN E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 27975–27981.
- [85] UM JH, KANG CD, BAE JH, SHIN GG, KIM DO W, KIM DW, CHUNG BS, KIM SH. Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp Mol Med* 2004; **36**: 233–242.
- [86] VAUPEL P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004; **9** Suppl 5: 10–17.
- [87] VAUPEL P, HARRISON L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004; **9** Suppl 5: 4–9.
- [88] WELSH SJ, BELLAMY WT, BRIEHL MM, POWIS G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2002; **62**: 5089–5095.
- [89] WELSH SJ, WILLIAMS RR, BIRMINGHAM A, NEWMAN DJ, KIRKPATRICK DL, POWIS G. The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-induced factor 1 α and vascular endothelial growth factor formation. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**: 235–243.
- [90] WENGER RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; **16**: 1151–1162.
- [91] WIESENER MS, MÜNCHENHAGEN PM, BERGER I, MORGAN NV, ROIGAS J, SCHWIERTZ A, JURGENSEN JS, GRUBER G, MAXWELL PH, LONING SA, FREI U, MAHER ER, GRONE HJ, ECKKARDT KU. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61**: 5215–5222.
- [92] YOO YG, YEO MG, KIM DK, PARK H, LEE MO. Novel function of orphan nuclear receptor Nur77 in stabilizing hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 2004; **279**: 53365–53373.
- [93] ZAGORSKA A, DULAK J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**: 563–585.
- [94] ZHANG W, LIU HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002; **12**: 9–18.
- [95] ZHONG H, CHILES K, FELDSER D, LAUGHNER E, HANRAHAN C, GEORGESCU MM, SIMONS JW, SEMENZA GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; **60**: 1541–1545.

- [96] ZHONG H, DE MARZO AM, LAUGHNER E, LIM M, HILTON DA, ZAGZAG D, BUECHLER P, ISAACS WB, SEMENZA GL, SIMONS JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; **59**: 5830–5835.
- [97] ZHOU J, SCHMID T, FRANK R, BRUNE B. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 13506–13513.
- [98] ZUNDEL W, SCHINDLER C, HAAS-KOGAN D, KOONG A, KAPER F, CHEN E, GOTTSCHALK AR, RYAN HE, JOHNSON RS, JEFFERSON AB, STOKOE D, GIACCIA AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; **14**: 391–396.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 05.11.2005 r.

Przyjęto: 15.11.2005 r.

ul. Banacha 1a, Blok F, 02-097 Warszawa

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

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

ZASTOSOWANIE NARZĘDZI BIOINFORMATYCZNYCH W BADANIU STRUKTURY I EKSPRESJI GENU ORAZ BUDOWY I FUNKCJI BIAŁKA NA PRZYKŁADZIE CZĄSTECZKI NCAM

APPLICATION OF BIOINFORMATIC TOOLS FOR THE ASSESSMENT
OF GENE AND PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION:
NCAM MOLECULE AS AN EXAMPLE

Mariusz KACZMAREK, Mirosław SZCZEPAŃSKI, Jan ŻEROMSKI

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej,
Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Dynamiczny rozwój nauk przyrodniczych oraz medycyny w dużej mierze zależy od rosnącej ilości zasobów baz danych oraz ich dostępności dla badaczy. Wszystkie ośrodki zajmujące się kolekcjonowaniem sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych wymieniają pomiędzy sobą informacje i aktualizują je wzajemnie. Pełną korzyść płynącą z tych zasobów daje dopiero ich odpowiednia analiza. Możliwość taką oferują liczne serwisy bioinformatyczne. Ich tworzeniem zajmuje się szeroka społeczność naukowa, udostępniając niekomercyjnie na stronach internetowych programy pozwalające analizować zgromadzone dane w różnych aspektach. Dla przykładu, o właściwościach biologicznych nerwowej cząsteczki adhezyjnej (NCAM) decydują liczne modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne. Podejście bioinformatyczne pozwala ocenić ich znaczenie. Dzięki użyciu programów bioinformatycznych wykazano między innymi, że NCAM ma teoretyczną możliwość obecności od 40 do 46 eksonów, podczas gdy sekwencja genetyczna wskazywała jedynie na obecność 20 eksonów. Stosując program Spidey uzyskano nowe dane o eksonie VASE wykazującym związki z obniżoną plastycznością mózgu. Przy pomocy innych programów określono szczegóły powstawania białka NCAM w komórce, jej formy transbłonowej i rozpuszczalnej, a także jej struktury trzeciorzędowej i możliwych modyfikacji. Wykazano zdolność NCAM do wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału i rolę fosforylacji białka w tym procesie. Zastosowanie dostępnych w internecie narzędzi bioinformatycznych w znacznym stopniu może przybliżyć do lepszego poznania struktury i biologii cząsteczki NCAM. Dzięki czemu staje się możliwe bardziej szczegółowe określenie jej funkcji w organizmie, zarówno w zdrowiu jak i w chorobie.

Słowa kluczowe: bioinformatyka, bazy danych i narzędzia, nerwowa cząsteczka adhezyjna – NCAM, modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne.

Summary: Rapid progress of biological and medical research depends largely on steadily growing information in online databases and its accessibility for researchers. All centers involved in the collection of nucleotide and amino acid sequences exchange and update available data. Full benefit from this information may be obtained only by proper analysis provided by several bioinformatic services. In their formation people from broad scientific community are engaged and their effects of work are accessible free of charge in internet. This software permits to analyze collected data in various aspects. For example, properties of neural cell adhesion molecule (NCAM) depend a lot on multiple posttranscriptional and posttranslational modifications. Bioinformatic approach allows to assess their significance. Due to bioinformatic tools it was shown that NCAM may theoretically possess 40 up to 46 exons, while genetic screening indicated 20 only. Application of Spidey software revealed novel data about VASE exon, showing links with decreased brain plasticity. Other tools permitted to obtain details about NCAM protein formation in the cell, its transmembrane and soluble forms as well as tertiary structure and its possible modifications. It was also shown that NCAM is able to intracytoplasmic signal transduction and emphasized the role of protein phosphorylation in this process. This will make possible to determine precisely the role of NCAM molecule both in health and disease.

Key words: bioinformatics, databases and tools, neural cell adhesion molecule – NCAM, posttranscriptional and posttranslational modifications.

WSTĘP

Dynamiczny rozwój nauk przyrodniczych oraz medycyny w dużej mierze zależy od rosnącej ilości zasobów baz danych oraz ich dostępności dla badaczy. Głównymi bazami zawierającymi sekwencje aminokwasowe i nukleotydowe są amerykańska GeneBank (*National Center for Biotechnology Information*), europejska EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) oraz japońska DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*). Do czołówki należą również trzy bazy kolekcjonujące jedynie sekwencje białkowe: SWISS-PROT, PIR (*Protein Information Resource*) oraz PDB (*Protein Data Bank*). Wszystkie te ośrodki wymieniają pomiędzy sobą informacje jednocześnie aktualizując je wzajemnie. Pełną korzyść płynącą z tych zasobów daje dopiero ich odpowiednia analiza. Możliwość taką oferują liczne serwisy bioinformatyczne. Ich tworzeniem zajmuje się szeroka społeczność naukowa, udostępniając niekomercyjnie na stronach internetowych programy pozwalające analizować sekwencje nukleotydowe i białkowe w różnych aspektach (tab.1).

Nerwowa cząsteczka adhezyjna, NCAM1 (*Neural Cell Adhesion Molecule 1*) [HUGO], zwana także CD56, po raz pierwszy została opisana w 1977 roku. Należy do dużej i dobrze poznanej nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych. Całą rodzinę nerwowych cząsteczek adhezyjnych pogrupowano na mniejsze podrodziny. W zależności od liczby zewnątrzkomórkowych domen immunoglobulinopodobnych typu C2 (Ig) oraz powtórzeń fibronektynowych typu III (FN) nadano im odpowiednie numery. NCAM reprezentuje rodzinę 5/2, która wykazuje obecność pięciu domen Ig oraz dwóch domen FN. Członkowie całej nadrodziny receptorów Ig-podobnych, do której oprócz NCAM i innych cząsteczek adhezyjnych należą między innymi Ig, TCR, CD4, CD8 i inne, są stałymi lub długotrwałymi składnikami błon komórkowych. Ich obecność wykazano w wielu tkankach w trakcie rozwoju oraz życia dorosłego [42]. Cząsteczka NCAM występuje w przyrodzie w trzech podstawowych izoformach: 180 kDa, 140

TABELA 1. Adresy internetowe baz danych, serwisów i programów bioinformatycznych wykorzystanych w przeprowadzonej analizie cząsteczki NCAM

Bazy danych, narzędzia	Adresy internetowe	Zastosowanie
<p>BAZY DANYCH</p> <p>GeneBank</p> <p>EMBL</p> <p>DDBJ</p> <p>SWISS-Prot</p> <p>PIR</p> <p>PDB</p> <p>HUGO Gene Nomenclature Committee</p> <p>ENSEMBL</p> <p>LocustLink</p> <p>GeneLoc</p> <p>UniProt</p>	<p>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</p> <p>http://www.ebi.ac.uk/embl/</p> <p>http://www.ddbj.nig.ac.jp/</p> <p>http://www.expasy.org/sprot/</p> <p>http://pir.georgetown.edu/home.shtml</p> <p>http://www.rcsb.org/pdb/</p> <p>http://www.ensembl.org/</p> <p>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</p> <p>http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc/index.shtml</p> <p>http://www.expasy.uniprot.org/</p>	<p>Baza danych National Center for Biotechnology Information</p> <p>Baza danych European Molecular Biology Laboratory</p> <p>Baza danych DNA Data Bank of Japan</p> <p>Baza danych sekwencji białkowych SWISS-PROT database</p> <p>Baza danych sekwencji białkowych Protein Information Resource</p> <p>Baza danych sekwencji białkowych Protein Data Bank</p> <p>Human Genome Organisation zatwierdza nazwy i symbole genów</p> <p>Ensembl Genome Browser</p> <p>Prezentuje zintegrowane mapy dla każdego ludzkiego chromosomu</p> <p>Prezentuje zintegrowane mapy dla każdego ludzkiego chromosomu</p> <p>Centralna baza danych sekwencji białkowych i ich funkcji</p>
<p>NARZĘDZIA</p> <p>ExpASY</p> <p>FASTA programs</p> <p>CBS Prediction Server</p> <p>The Predict Protein Server</p> <p>ProParam</p> <p>IMolTalk</p> <p>Swiss-Pdb Viewer</p> <p>Cn3D 4.1</p> <p>ASPC</p> <p>Spidecy</p> <p>ClustalW</p> <p>SecretomeP</p> <p>SignalP</p> <p>BigPi Predictor</p> <p>Kate Doolittle hydrophathy plots</p> <p>TMHMM</p> <p>Sosui</p> <p>HMMTOP</p> <p>TMpred</p> <p>TMap</p> <p>NetN Glyc</p> <p>NetO Glyc</p> <p>NetPhos</p>	<p>http://au.expasy.org/</p> <p>http://fasta.bioch.virginia.edu/</p> <p>http://www.cbs.dtu.dk/services/</p> <p>http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/</p> <p>http://www.expasy.org/tools/protparam.html</p> <p>http://moltalk.org/</p> <p>http://www.expasy.org/spdbv/</p> <p>http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml</p> <p>http://aspic.algo.discu.unimab.it/</p> <p>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidecy/</p> <p>http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</p> <p>http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0/</p> <p>http://mendel.irp.univie.ac.at/sat/gp/plant_server.html</p> <p>http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www/grease.htm</p> <p>http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</p> <p>http://sosui.proteome.bio.nat.ac.jp/sosuffam0.html</p> <p>http://www.enzmm.hu/hmmtop/</p> <p>http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</p> <p>http://bioinf.limbo.itm.lu.se/tmap</p> <p>http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</p> <p>http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/</p> <p>http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</p>	<p>ExpASY (Expert Protein Analysis System) analiza sekwencji i struktur białkowych</p> <p>Przeszukiwanie baz danych sekwencji białkowych i DNA</p> <p>Center for Biological Sequence Analysis</p> <p>Serwis predykcji struktury, analizy sekwencji i funkcji białka</p> <p>Pozwala określić różne fizyczne i chemiczne parametry białka</p> <p>Interaktywny serwis dla analizy struktury białka</p> <p>Program do analizy, wizualizacji i porównania struktur 3D białka</p> <p>Program do analizy, wizualizacji i porównania struktur 3D białka</p> <p>ASPC (Alternative Splicing Prediction) analiza struktury genu</p> <p>Program porównujący sekwencję genomową z mRNA genu</p> <p>Serwer do porównywania wielu sekwencji genów i białek</p> <p>Predykcja bkalizacji komórkowej białka</p> <p>Predykcja peptydu sygnałowego</p> <p>Predykcja wiązania GPI</p> <p>Analiza sekwencji hydrofobowych</p> <p>Predykcja sekwencji transbłonowych białka</p> <p>Predykcja sekwencji transbłonowych białka</p> <p>Predykcja sekwencji transbłonowych białka</p> <p>Predykcja sekwencji transbłonowych białka</p> <p>Predykcja sekwencji transbłonowych białka</p> <p>Predykcja miejsc N-glikozylacji w obrębie ludzkich białek</p> <p>Predykcja miejsc O-glikozylacji w obrębie białek ssaków</p> <p>Predykcja miejsc fosforylacji w komórkach eukariotycznych</p>

Narzędzia – serwisy i programy bioinformatyczne

kDa oraz 120 kDa [44]. Bazy danych NCBI oraz SWISS-Prot zawierają jednak tylko dwie sekwencje referencyjne, których obecność wykazano w organizmie człowieka. Są to cząsteczki o masie 140 kDa (wariant o długości 848 AA NCBI [[>gi|10834990|ref|NP_000606.1|](#)]; Swiss-Prot [P13591] oraz wariant o długości 858 AA NCBI [[>gi|41281937|ref|NP_851996.1|](#)] i 120 kDa (obydwa warianty o długości 761 AA Swiss-Prot [P13592-1] oraz [P13592-2]). Obecność izoforny o masie 180 kDa wykazano w komórkach mysich *Mus musculus* [UniProt: P13595], żaby szponiastej *Xenopus laevis* [UniProt: P16170], traszki z gatunku *Cynops pyrrhogaster* [UniProt: O57576], a także u kury domowej *Gallus gallus domestica* [UniProt: P13590].

STRUKTURA GENU I MODYFIKACJE POTRANSKRYPCYJNE

Gen o długości 70 tysięcy par zasad, kodujący NCAM został zmapowany na długim ramieniu chromosomu 11 [LocusLink i Ensembl: 11q23.1; GeneLoc: GC11P112369]. Pełen zestaw właściwości biologicznych oraz funkcji pełnionych przez cząsteczkę NCAM nie został ostatecznie poznany. Wiadomo jednak, że budowa i funkcjonowanie tej struktury mogą być modyfikowane w drodze regulacji ekspresji genu, lokalizacji białka oraz interakcji z innymi białkami [35]. Wszystkie różniące się między sobą warianty białka nerwowej cząsteczki adhezyjnej powstają w drodze alternatywnego składania (*splicing*). Ogólnie wyróżniamy cztery główne typy *splicing*u różnicowego: z użyciem różnych promotorów, z zatrzymaniem intronów w dojrzałych cząsteczkach, z pozostawianiem lub usuwaniem poszczególnych eksonów oraz z użyciem różnych miejsc poli(A). Mechanizm dojrzewania mRNA kodującego poszczególne warianty NCAM podobny jest do obserwowanego w trakcie dojrzewania transkryptów immunoglobulin. Użycie dalszego, silniejszego miejsca poli(A) powoduje, że dojrzały mRNA zawiera eksony kodujące regiony odpowiedzialne za kotwiczenie białka w błonie, tzw. *stop-transfer*. Wykorzystanie natomiast miejsca bliższego, tj. słabszego, skutkuje powstawaniem formy rozpuszczalnej immunoglobulin [23].

Przyjmuje się, że całkowita sekwencja genetyczna różnych izoform ludzkiej cząsteczki NCAM może wykazywać obecność maksymalnie 20 eksonów. Określono, że eksony 1–14 kodują domeny zewnątrzkomórkowe, ekson 15 odpowiedzialny jest za fragment transbłonowy, natomiast pozostałe eksony odpowiadają za wewnątrzplazmatyczną sekwencję cząsteczki. Zaobserwowano, że w trakcie rozwoju serca szczura, w wyniku różnych przetasowań eksonów może powstać przynajmniej 27 różnych wariantów mRNA. Wykorzystanie programu ASPic ujawniło teoretyczną możliwość obecności od 40 do 46 eksonów, które w zależności od zadanych stopni swobody w wyniku różnych rearanżacji mogą tworzyć od 25 do 55 różnych transkryptów. Zadaniem tego narzędzia bioinformatycznego jest przewidywanie struktury alternatywnie składanych transkryptów na podstawie porównania odpowiedniej sekwencji genomowej z poznanymi znacznikami sekwencji ulegających ekspresji (EST). Część z przewidzianych w ten sposób eksonów oraz tworzonych przez nie transkryptów może mieć znaczenie wyłącznie teoretyczne. Sekwencje mRNA czterech podstawowych wariantów NCAM dostępne są w bazach danych [Ensembl: ENST00000316851, ENST00000350484, ENST00000359771,

ENST00000356076]. Aby określić lokalizację poszczególnych eksonów znajdujących się w obrębie różnych transkryptów, można posłużyć się obecnym na stronie NCBI programem Spidey, który umożliwia zestawienie wybranych sekwencji mRNA z odpowiednią sekwencją referencyjną DNA [dla NCAM; GeneBank: NT_033899].

Obecność i rodzaj alternatywnie składanych eksonów decyduje o długości poszczególnych transkryptów NCAM. Pierwszą zidentyfikowaną strukturą tego typu był zlokalizowany pomiędzy eksonami 7 i 8 tzw. ekson VASE (*Variable Alternative Spliced Exon*) o długości 30 par zasad [40]. Wykorzystanie programu Spidey może być pomocne w wykazaniu, że fragment ten stanowi odrębny ekson, eliminowany w trakcie dojrzewania mRNA. Dotychczas nieznane są uwarunkowania występowania tej sekwencji, jednak liczne dowody sugerują, że występuje związek pomiędzy VASE a obniżoną plastycznością mózgu. Przemawia za tym fakt, iż ilość cząsteczek NCAM wykazujących obecność tego eksonu wzrasta wraz z wiekiem. W 1992 roku Doherty wraz ze współpracownikami wykazał, że obecności VASE może towarzyszyć obniżenie wzrostu neurytów. Kolejną wykrytą sekwencją alternatywnie składaną jest tzw. MSD-1 (*Muscle-Specific Domain 1*). Jest to fragment o długości 108 pz. zlokalizowany w miejscu splicingu pomiędzy eksonami 12 i 13, który składa się z trzech krótkich eksonów o długości 15, 48 i 42 par zasad oraz dodatkowego tripletu AAG w pozycji 3' sąsiadującego z eksonem 13. Te trzy krótkie eksony mogą być włączane w dowolny sposób (np. ex12-ex13, ex12-a15-ex13 albo ex12-a15-a48-a42-ex13) powodując różnice w budowie transkryptów NCAM. Jak dotąd strukturę tę wykazano wyłącznie w mięśniach zarówno szkieletowych, jak i w mięśniu sercowym [1, 31]. Alternatywnie składanym eksonem jest również sekwencja SEC (*Secreted Exon*). Obecność tego 76 nukleotydowego fragmentu powoduje przedwczesną terminację translacji oraz utratę przez syntetyzowane białko domeny cytoplazmatycznej lub transbłonowej [41]. Szacuje się, że jeśli wszystkie zidentyfikowane kombinacje eksonów obecnych w genie kodującym NCAM uległyby translacji, mogłoby powstać ponad 192 kombinacji, które skutkowałyby powstaniem takiej samej ilości białek. Jednak funkcje wielu z nich nadal są nieznane.

Program ClustalW pozwala wskazać podobieństwa i różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami NCAM zarówno w obrębie sekwencji nukleotydowych, jak i aminokwasowych. Analiza homologii międzycząsteczkowej przeprowadzona przy pomocy tego narzędzia może wskazać, w jaki sposób alternatywnie składane eksony mogą modulować sekwencje aminokwasowe badanych wariantów.

BUDOWA BIAŁKA I MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE

Wszystkie modyfikacje potranskrypcyjne prowadzą w konsekwencji do powstania trzech form białka, które różnią się pomiędzy sobą strukturą, lokalizacją i funkcją. Nerwowa cząsteczka adhezyjna może występować w formie transbłonowej oraz może być zakotwiczona w błonie komórkowej przy pomocy kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolowej (GPI) [43]. Wykazano również obecność formy rozpuszczalnej. Zastosowanie programu SecretomeP 1.0 [5], pozwala wstępnie określić lokalizację

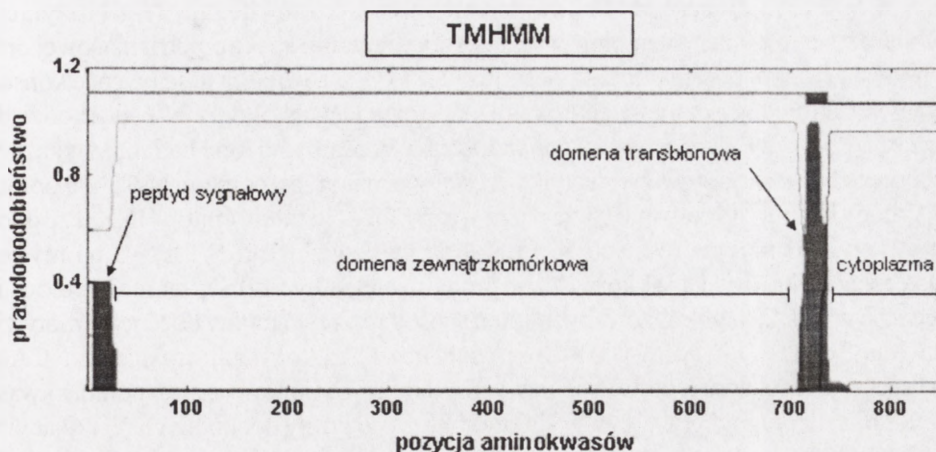
komórkową badanego białka, tzn. czy analizowana proteina pozostaje w obrębie komórki, czy jest wydzielana na zewnątrz. Przewidywanie lokalizacji białka NCAM przeprowadzone przy pomocy tego programu wykazało, że spośród czterech badanych wariantów potencjalnie dwa mogą być wydzielane na zewnątrz komórki. Obok modyfikacji potranskrypcyjnych drugą, jeszcze liczniejszą grupą zjawisk zachodzących w przebiegu dojrzewania cząsteczki NCAM stanowią modyfikacje potranslacyjne. Ogólnie wyróżnia się trzy podstawowe kategorie modyfikacji białek, tj. modyfikacje zachodzące z rozerwaniem wiązań chemicznych, głównie peptydowych, modyfikacje grupy α -aminowej i α -karboksylowej oraz modyfikacje łańcuchów bocznych. W trakcie dojrzewania cząsteczki NCAM wykazano wiele różnych modyfikacji. Są to głównie hydroliza peptydu sygnałowego, tworzenie kotwicy GPI oraz synteza mostków dwusiarczkowych. Pośród modyfikacji łańcuchów bocznych najważniejszymi, decydującymi o różnorodności biologicznego działania tego białka są różne formy glikozytacji, zwłaszcza polisjalylacja, a także inne modyfikacje, takie jak fosforylacja i sulfatacja.

PEPTYD SYGNAŁOWY, SEKWENCJE TRANSBLONOWE, KOTWICA GPI

Pierwszą modyfikacją nowopowstałego propeptydu jest hydroliza tzw. peptydu sygnałowego. Zadaniem tej sekwencji jest przeprowadzenie nowopowstałej cząsteczki białka przez tzw. translokon do światła szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (*rough endoplasmic reticulum* – RER), gdzie zostaje poddana kolejnym etapom nabierania kompetencji. W obrębie prekursorów wszystkich izoform NCAM na końcach N obecne są wysoce hydrofobowe, 19 nukleotydowe sekwencje sygnałowe [45]. W celu identyfikacji peptydu sygnałowego można zastosować program SignalP 3.0 [6].

Po odcięciu peptydu sygnałowego białko przechodzi dalej do światła RER. Jednak niektóre warianty NCAM w swojej strukturze wykazują obecność szczególnej hydrofobowej domeny, która hamuje ten ruch. Jest to wspomniana wyżej sekwencja stop-transfer, która unieruchamia przechodzące białko w błonie retikulum. Występowanie zarówno peptydu sygnałowego, jak i sekwencji stop-transfer charakteryzuje cząsteczkę NCAM jako integralne białko błonowe typu I. Określenie topografii sekwencji transblonowej umożliwiają liczne narzędzia bioinformatyczne, są to między innymi programy, takie jak: TMHMM, SOSUI, HMMTOP [39], TM Pred [21] czy TMap [33]. Wskazanie fragmentów hydrofobowych łańcucha białkowego umożliwia również program *Kyte-Doolittle hydrophathy plot* [29]. Wykorzystanie tego narzędzia pozwoliło określić, że zarówno forma transblonowa NCAM, jak i związana kotwicą glikozylfosfatydyloinozytolową wykazują obecność wysoce hydrofobowej sekwencji, jaką jest sekwencja stop-transfer (ryc.1).

Modyfikacja potranslacyjna związana z powstawaniem wiązania lipidowego GPI obejmuje zarówno modyfikacje zachodzące z rozerwaniem wiązania peptydowego, jak i glikozylację. GPI jest to struktura przyłączająca białko NCAM do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W ciągu niecałej minuty po wniesieniu białka do retikulum endoproteazy odcinają część poza błonową, natomiast transaminazy przyłączają do



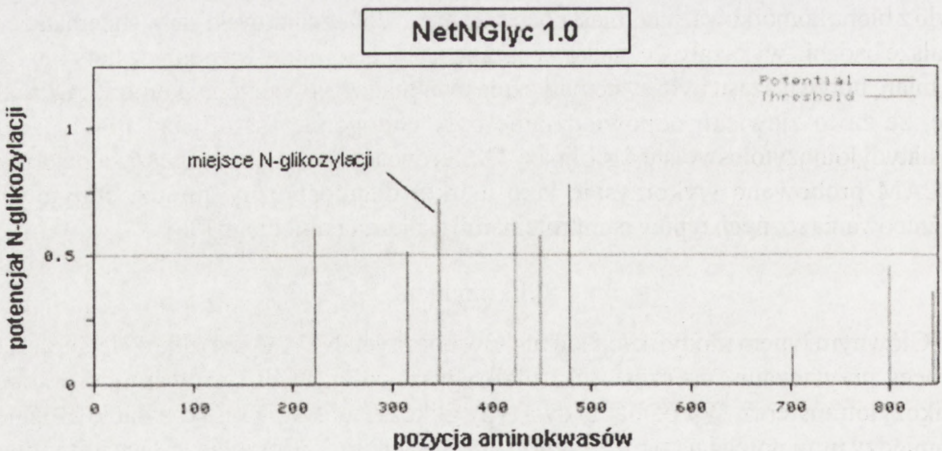
RYCINA 1. Zastosowanie programu TMHMM w celu identyfikacji domeny transbłonowej izoformy NCAM 140 kDa [NP_000606]. Domena zlokalizowana jest pomiędzy 714 a 736 aminokwasem łańcucha peptydowego (sekwencja: *IVGILIVIFVLLLIVVVDITCYFL*)

wolnego końca karboksylowego kotwicę GPI. Tak zmodyfikowane białko wydostaje się w trakcie transportu pęcherzykowego na powierzchnię komórki. Sygnał określający wystąpienie tej modyfikacji zawarty jest wewnątrz sekwencji znajdującej się na styku części błonowej i pozabłonowej białka w miejscu omega, tzw. *o-side* [14]. Teoretyczne przewidywanie wystąpienia wiązania GPI umożliwia między innymi program Big-P Predictor [13]. Analiza wykonana za pomocą tego programu wykazała, że dwa z czterech badanych wariantów NCAM posiadają w swojej strukturze miejsce omega. Są to te same warianty, które według programu SecretomeP 1.0 teoretycznie mogą być wydzielane na zewnątrz komórki. W trakcie frakcjonowania tkanki mózgowej szczura wykazano, że około 75% cząsteczek wariantu NCAM o masie cząsteczkowej 120 kDa związanych było z błoną komórkową, natomiast pozostałe około 25% znajdowało się w supernatancie. Dalsze badania wykazały, że białko związane z błoną komórkową poprzez kotwicę GPI w miarę upływu czasu było systematycznie uwalniane z powierzchni komórki. Okazało się, że za to zjawisko odpowiedzialne były endogenne fosfolipazy PI-PLC, tzn. fosfatydyloinozytoloswoiste fosfolipazy C. Obecność w surowicy rozpuszczalnej formy NCAM próbowano wykorzystać jako marker diagnostyczny, między innymi dla różnicowania różnych typów paraproteinemii szpiczaka mnogiego [36].

Glikozylacja

Głównym typem modyfikacji łańcuchów bocznych NCAM jest glikozylacja. Jest to proces przyłączania do cząsteczki białka reszt cukrowych sterowany za pomocą glikozylotransferaz. Wyróżniamy dwa typy glikozylacji: *N*- i *O*-glikozylację. Różnica pomiędzy nimi polega na tym, że synteza oligosacharydów przyłączonych wiązaniem *O*-glikozylowym zachodzi na drodze kolejnego dodawania jednostek monosacharydowych do powstającego białka. Natomiast oligosacharyd przyłączony wiązaniem *N*-glikozylowym powstaje na odpowiednim nośniku lipidowym, jakim jest np. fosforan dolicholu i dopiero w tej postaci zostaje przyłączany do białka [18]. W cząsteczce

NCAM występuje sześć reszt aminokwasowych, które ulegają *N*-glikozylacji. Potwierdzono to eksperymentalnie wykorzystując techniki spektrometrii masowej oraz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej HPLC [30]. Miejsca te są wysoce konserwatywne pomiędzy różnymi gatunkami. W pozycjach N-5 oraz N-6 dochodzi do wiązania PSA, czyli kwasu α -2,8 polisialowego. Przeprowadzone badania wykazały, że domena N-1 modyfikowana jest tylko częściowo, natomiast domeny N-5 i N-6 oprócz PSA mogą być modyfikowane także przez ważny funkcjonalnie epitop HNK-1. Epitop ten odkryto również na resztach N-2 i N-4 na bydłych oraz N-2 i N-3 na mysich cząsteczkach NCAM [1]. Wykorzystując program NetNGlyc 1.0 Server można określić obecność wszystkich glikolizowanych w ten sposób reszt asparaginy obecnej w motywie Asn-Xaa-Ser/Thr [8] (ryc. 2). Głównym substratem glikozylacji cząsteczki NCAM oraz ważnym regulatorem powierzchniowych interakcji komórkowych jest polimer kwasu α -2,8-polisialowego (PSA). Kwasy sjałowe należą do grupy pochodnych *N*- i *O*-acylowych kwasu neuraminowego (NeuAc). Syntetyzowane są w aparacie Golgiego z *N*-acetyl-*D*-mannozoaminy (ManNAc), a następnie aktywowane w jądrze komórkowym do CMP-SA. Ilość kwasów sjałowych w komórce może być regulowana w drodze specyficznych przemian metabolicznych. Wykazano, że PSA nadaje cząsteczce NCAM ładunek ujemny, którego wartość wzrasta wraz z ilością przyłączonych jednostek. Obecność kwasu polisialowego (poliSia) moduluje interakcje komórkowe zarówno w trakcie rozwoju, jak i onkogenezy [11]. Polisjalylacja wpływa na homofilne połączenia komórka-komórka oraz zmienia właściwości transdukcji sygnału cząsteczki NCAM [15]. Wykazano, że PSA-NCAM odgrywa główną rolę w trakcie rozwoju mózgu, regeneracji układu nerwowego, a także w procesach plastyczności mózgu obejmujących uczenie się oraz procesy pamięci. Polisjalylowany NCAM obecny jest również na powierzchni komórek różnych endokrynych nowotworów wykazujących duży stopień złośliwości, a ich ilość koreluje ze złą prognozą w przebiegu choroby. Biosyntezę poliSia katalizują



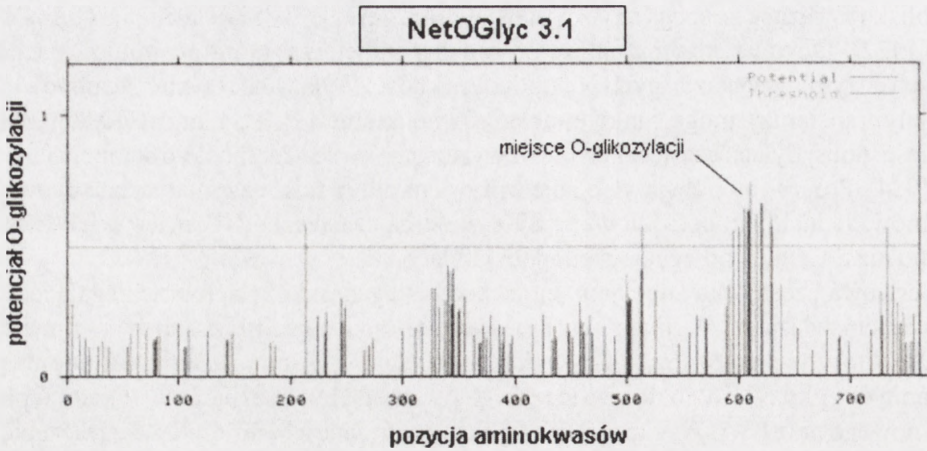
RYCINA 2. Predykcja miejsc ulegających *N*-glikozylacji w obrębie transbłonowej izoformy NCAM 140 kDa [NP_000606] przy pomocy programu NetNGlyc 1.0. Modyfikacji tej ulegają zaznaczone reszty asparaginowe obecne w motywach Asn-Xaa-Ser/Thr (pozycje aminokwasowe: 222, 315, 347, 423, 449, 478)

dwa blisko związane ze sobą enzymy, polisjalyltransferazy ST8SiaII (PST) i ST8SiaIV (STX) [22]. Obydwa enzymy należą do rodziny transferaz, która obejmuje siedem różnych enzymów wykazujących podobną aktywność. Wykazano również, że obydwie polisjalyltransferazy mogą funkcjonować równocześnie [2]. PST oraz STX oprócz zdolności polisjalylacji cząsteczki NCAM wykazują również zdolność do autopolisjalylacji [3, 4]. Proces autopolisjalylacji nie wpływa na aktywność enzymatyczną obydwu enzymów. Jednak autopolisjalylowany STX zmienia cząsteczkę NCAM w większym stopniu niż STX nie podlegający autopolisjalylacji [11].

Nerwowa cząsteczka adhezyjna może także ulegać glikozylacji przebiegającej z powstaniem wiązania *O*-glikozyłowego. Ten typ modyfikacji opisano w wariantcie NCAM, który w swojej strukturze wykazuje obecność eksonu MSD-1. Za pomocą wiązania *O*-glikozyłowego do cząsteczki NCAM mogą być przyłączane glikany typu mucynowego oraz PSA. Wykazano, że *O*-glikany związane z MSD-1 ułatwiają łączenie mioblastów, podczas gdy polisjalylacja *N*-glikanów przyłączonych do NCAM ogranicza ten proces. Obecność PSA wraz z glikanami typu mucynowego połączonymi z cząsteczką NCAM wiązaniem *O*-glikozyłowym wykazano w rakach piersi oraz w komórkach białaczkowych. *O*-glikany typu mucynowego z reguły są zgrupowane tworząc naturalną ochronę białka przed działaniem proteaz. Wykazano, że NCAM bez MSD jest relatywnie giętka, natomiast NCAM z *O*-glikozyłowanym MSD jest bardziej sztywna i wykazuje zmiany konformacji, przez co ułatwia tworzenie połączeń pomiędzy komórkami [38]. W celu określenia miejsc *O*-glikozylacji można zastosować program NetOGlyc 3.1 Server [26]. Zastosowanie tego programu pozwoliło potwierdzić wcześniejsze dane zgodnie, z którymi liczne miejsca *O*-glikozylacji są skupione w obszarach występowania produktu białkowego alternatywnego eksonu MSD-1 (ryc. 3).

Fosforylacja i transdukcja sygnału

Szczególnie ważną modyfikacją potranslacyjną, która w istotny sposób determinuje funkcje biologiczne białek, jest fosforylacja. Polega ona na dostarczeniu do seryny, tyrozyny i treoniny *N*- i *O*-fosfopochodnych. Miejsce przyłączenia do łańcucha peptydowego fosforanu może stanowić receptor dla wielu kinaz białkowych, które mogą brać udział w wielu wewnątrzkomórkowych procesach sygnalizacyjnych. Wiadomo, że cząsteczki NCAM mogą ulegać fosforylacji. Wykorzystanie programu NetPhos 2.0 pozwala stwierdzić, które reszty w łańcuchach aminokwasowych poszczególnych wariantów NCAM mogą teoretycznie ulegać fosforylacji [7]. W ten sposób można wskazać zarówno reszty tyrozynowe, jak i serynowo/treoninowe. Aby dokładniej ustalić, które kinazy mogą wiązać się z badaną cząsteczką białka, można przeprowadzić analizę porównawczą, której celem jest poszukiwanie homologii pomiędzy badaną sekwencją aminokwasową a zawartymi w bazach danych motywami charakterystycznymi występującymi w obrębie innych znanych białek. Taką analizę wykonuje serwis internetowy *The Predict Protein Server* [34]. Przy pomocy tego serwisu ustalono obecność motywów homologicznych dla białkowej kinazy C (PKC), kinazy kazeinowej typu II (CK2) oraz kinazy tyrozynowej (TYR). Ostatnio przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę, która zakłada, że NCAM bierze aktywny udział w transdukcji sygnału. Cząsteczka ta może inicjować przynajmniej dwa różne szlaki przekazywania.



RYCINA 3. Predykcja miejsc ulegających *O*-glikozylacji w obrębie zakotwiczonej wiązaniem GPI w błonie komórkowej izoformy NCAM 120 kDa [P13592-2]. Modyfikacji tej ulegają reszty seryny i treoniny, ich duże zagęszczenie wyraźne jest w obrębie sekwencji kodowanej przez ekson MSD-1 (pozycje pomiędzy 595 a 630 aminokwasem)

Bezpośrednio poprzez związaną z trawami lipidowymi w błonie komórkowej kinazę tyrozynową Fyn oraz pośrednio przy współdziałaniu receptora dla fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR) [19]. Ten schemat aktywacji ilustruje zdarzenia, które zachodzą w komórce od momentu aktywacji NCAM do transkrypcji lub zmian w dynamice cytoszkieletu [37]. Pobudzenie FGFR może przebiegać z jednoczesną aktywacją fosfolipazy C γ (PLC γ) biorącej udział w wytwarzaniu diacyloglicerolu (DAG), który w wyniku działania lipazy DAG przekształca się w kwas arachidonowy (AA) aktywujący neuronowy kanał wapniowy [28]. Wykazano również możliwość aktywacji szlaku kinazy Ras-MAP, która może zachodzić z dwóch różnych kierunków. Z jednej strony w wyniku aktywacji kinazy FAK, która następnie przyłączana jest do białka adaptorowego p59fyn [9], bądź z drugiej strony w wyniku aktywacji cząsteczek adaptorowych ShcA, Frs2 oraz Grb2 [20]. Obydwa szlaki prowadzą do uruchomienia kinaz serynowych ERK, które z kolei aktywują transkrypcję genów odpowiedzialnych za procesy mitogenne oraz różnicowanie komórek. Ustalono między innymi, że fosforylacja cząsteczki NCAM w konsekwencji może prowadzić do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak GRE (*Glucocorticoid Responce Element*) oraz NF- κ B [12]. Wykazano również, że neurytogeneza zachodząca przy udziale NCAM może zachodzić w wyniku aktywacji czynników transkrypcyjnych CREB (*cAMP-Response-Element Binding Protein*) oraz c-Fos indukowanych przez cAMP/PKA [24].

Transbłonowa izoforma cząsteczki NCAM może stanowić również alternatywny receptor dla rodziny ligandów GDNF (GFL), do której należą czynniki neurotrofowe, takie jak: neurotrofiny, neurokiny oraz GDNF (*Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor*) [32]. Wykazano, że w normalnych warunkach cząsteczki GFL oddziałują ze swoistymi dla siebie receptorami GFR α 1. W przypadku ich nieobecności, ligandy GDNF mogą łączyć się z NCAM, tworząc wiązania o niskim powinowactwie. Jednak, gdy

nerwowym cząsteczkom adhezyjnym towarzyszy związany z nimi receptor $GFR\alpha 1$, wówczas GDNF wiąże się z NCAM wiązaniem o silnym powinowactwie, a następnie aktywuje znajdującą się w cytoplazmie Src-podobną kinazę Fyn oraz centralną kinazę adhezyjną FAK [37]. Taka możliwość interakcji pomiędzy sąsiadującymi z NCAM białkami obecnymi w tej samej błonie komórkowej określa ich zdolność do oddziaływań cis. Są to homo- i heterofilne interakcje występujące pomiędzy cząsteczkami zlokalizowanymi w błonie komórkowej tej samej komórki. Równocześnie cząsteczki NCAM wykazują zdolność do oddziaływań homo- i heterofilnych pomiędzy różnymi komórkami, czyli do tzw. oddziaływania trans [12]. Dzięki tym interakcjom możliwa jest adhezja, która zachodzi pomiędzy komórkami poprzez wiązania homofilne formowane pomiędzy zewnątrzkomórkowymi domenami Ig-podobnymi. Wykorzystując badania krystalograficzne, NMR oraz mikroskopię elektronową wykazano, że najsilniejsze wiązania homofilne występują pomiędzy pierwszą domeną Ig jednej cząsteczki NCAM i 5 domeną Ig drugiej cząsteczki. Wykazano również biologiczne znaczenie wiązania pomiędzy pierwszą Ig jednej i trzecią Ig drugiej. Nie określono jednak, jak dotąd, znaczenia wiązania występującego pomiędzy pierwszą Ig jednej i drugą Ig drugiej. Najprawdopodobniej wiązanie tego typu tworzy początkowy uchwyt na relatywnie dużej odległości pomiędzy błonami komórkowymi. Te wszystkie rodzaje wiązań pozwalają komórkom regulować wzajemne ułożenie w przestrzeni [25].

STRUKTURA I-, II- I III-RZĘDOWA BIAŁKA

Ze względu na strukturę trzeciorzędową, białka NCAM zalicza się do białek klasy II. Do tej klasy należą białka, w których dominują struktury tzw. β -harmonijkowe, najczęściej w postaci łańcuchów przeciwbieżnych. Trwałość tej strukturze nadają mostki dwusiarczkowe. Wiązania te należą do grupy wiązań kowalencyjnych, czyli najsilniejszych między resztami aminokwasów. Powstają one w wyniku odwodornienia grup $-SH$ pomiędzy cysteinami zawartymi w domenach immunoglobulinopodobnych. Takich mostków dwusiarczkowych w cząsteczce NCAM jest pięć, po jednym w każdej domenie Ig. Kształt pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej struktury badanego białka można określić przy pomocy programów zawartych np. w serwisie ExpASy. Są to między innymi ProtParam, program określający parametry fizyko-chemiczne sekwencji białkowej (budowę aminokwasową i atomową, punkt izoelektryczny pI , itd.) [16], The Predict Protein Server [34], bądź interaktywny serwer analizy struktury białka iMolTalk. Dostępne są również narzędzia umożliwiające modelowanie molekularne i wizualizację struktury trójwymiarowej białka, najpopularniejszymi są Swiss-PdbViewer [17] oraz Cn3D 4.1 [10].

INNE RODZAJE MODYFIKACJI

Serwis The Predict Protein Server obok możliwych miejsc homologicznych dla wybranych kinaz wskazał również obecność innych homologii. W obrębie drugiej domeny fibronektynowej zlokalizowano motyw A, czyli miejsce wiązania ATP/GTP, tzw. pętlę

P. Obecność tej sekwencji wskazuje na potencjalną możliwość wiązania i hydrolizy przez NCAM zewnątrzkomórkowego ATP, którą skojarzono z plastycznością synaptyczną zależną od adhezji stymulowanej przez NCAM [27]. Dyskusyjne pozostaje znaczenie tego motywu w trakcie różnych oddziaływań cis cząsteczki NCAM. W obrębie tej struktury wykazano również obecność domen homologicznych z rodziną fosfofruktokinaz (PFK) zależnych od ATP, czyli enzymów katalizujących transfer grup fosforylowych z ATP. Jednym z enzymów wykorzystujących tę reakcję jest fosfofruktokinaza, która katalizuje fosforylację fruktozo-6-fosforanu do fruktozo-1,6-bisfosforanu, kluczowej reakcji regulacyjnej w szlaku glikolitycznym. Serwer Predict Protein wskazuje również, na teoretyczną możliwość występowania modyfikacji zachodzącej z przyłączeniem do cząsteczki NCAM innego lipidu, jakim jest mirystynian. Mirystylacja pozwala na zakotwiczenie białka jego końcem N w błonie komórkowej od strony cytozolu. Dodatkowo wskazano na możliwość występowania na końcu karboksylowym białka miejsca wiążącego mikrociała (peroksosomy), czyli niewielkie organelle komórkowe zawierające enzymy z grupy oksydoreduktaz. Ten typ modyfikacji może świadczyć o ewentualnym uczestnictwie cząsteczki NCAM w rearanżacji cytoszkieletu w trakcie przemian metabolicznych zachodzących w komórce.

KORZYŚCI Z ZASTOSOWANIA NARZĘDZI BIOINFORMATYCZNYCH

Zastosowanie dostępnych w internecie narzędzi bioinformatycznych umożliwiających szczegółowe przewidywanie właściwości fizycznych, chemicznych i biochemicznych makrocząsteczek w znacznym stopniu przybliża badaczy do lepszego poznania struktury i biologii organizmów żywych. Możliwość wykorzystania konkretnych i sprawdzonych informacji dostępnych w bazach danych pozwala na bardziej szczegółowe zaplanowanie eksperymentów naukowych. Takie nowoczesne podejście umożliwia znacznie precyzyjniej określić nieznane dotąd funkcje poszczególnych molekuł. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że dzięki tym narzędziom będzie można znacznie dokładniej i szybciej określić działanie biologiczne i ewentualne skutki niepożądane naturalnych i syntetycznych biopreparatów, coraz częściej stosowanych w terapii, zarówno u ludzi jak i zwierząt.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALBACH C, DAMOC E, DENZINGER T, SCHACHNER M, PRZYBYLSKI M, SCHMITZ B. Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2004; **378**: 1129–1135.
- [2] ANGATA K, FUKUDA M. Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie* 2003; **85**: 195–206.
- [3] ANGATA K, SUZUKI M, FUKUDA M. ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 36808–36817.

- [4] ANGATA K, SUZUKI M, MCAULIFFE J, DING Y, HINDSGAUL O, FUKUDA M. Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J Biol Chem* 2000; **275**: 18594–18601.
- [5] BENDTSEN JD, JENSEN LJ, BLOM N, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 2004; **17**: 349–356.
- [6] BENDTSEN JD, NIELSEN H, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; **340**: 783–795.
- [7] BLOM N, GAMMELTOFT S, BRUNAK S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; **294**: 1351–1362.
- [8] BLOM N, SICHERITZ-PONTEN T, GUPTA R, GAMMELTOFT S, BRUNAK S. Prediction of post translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004; **4**: 1633–1649.
- [9] BODRIKOV V, LESHCHYNS'KA I, SYTNYK V, OVERVOORDE J, DEN HERTOEG J, SCHACHNER M. RPTPalpa is essential for NCAM-mediated p59fyn activation and neurite elongation. *J Cell Biol* 2005; **168**: 127–139.
- [10] CHEN J, ANDERSON JB, DEWEESE-SCOTT C, FEDOROVA ND, GEER LY, HE S, HURWITZ DI, JACKSON JD, JACOBS AR, LANCZYCKI CJ, LIEBERT CA, LIU C, MADEJ T, MARCHLER-BAUER A, MARCHLER GH, MAZUMDER R, NIKOLSKAYA AN, RAO BS, PANCHENKO AR, SHOEMAKER BA, SIMONYAN V, SONG JS, THIESSEN PA, VASUDEVAN S, WANG Y, YAMASHITA RA, YIN JJ, BRYANT SH. MMDB: Entrez's 3D-structure database. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 474–477
- [11] CLOSE BE, WILKINSON JM, BOHRER TJ, GOODWIN CP, BROOM LJ, COLLEY KJ. The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* 2001; **11**: 997–1008.
- [12] CROSSIN KL, KRUSHEL LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 2000; **218**: 260–279.
- [13] EISENHABER B, BORK P, EISENHABER F. Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Eng.* 2001; **14**: 17–25.
- [14] EISENHABER F, EISENHABER B, KUBINA W, MAURER-STROH S, NEUBERGER G, SCHNEIDER G, WILDPANER M. Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-Pi, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 3631–3634.
- [15] GALLAGHER HC, MURPHY KJ, FOLEY AG, REGAN CM. Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J Neurochem* 2001; **77**: 425–434.
- [16] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, DUVAUD S, WILKINS MR, APPEL RD, BAIROCH A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. W: John M. Walker (red.) The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press 2005: 571–607.
- [17] GUEx N, PEITSCH MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; **18**: 2714–2723.
- [18] HAMES BD, I HOOPER NM. Glikozylacja białek. W: Krótkie wykłady: Biochemia wyd. II, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004: 271–277.
- [19] HINSBY AM, BEREZIN V, BOCK E. Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci* 2004; **9**: 2227–2244.
- [20] HINSBY AM, LUNDFALD L, DITLVESEN DK, KORSHUNOVA I, JUHL L, MEAKIN SO, BEREZIN V, BOCK E. ShcA regulates neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecule but not by fibroblast growth factor 2: evidence for a distinct fibroblast growth factor receptor response to neural cell adhesion molecule activation. *J Neurochem* 2004; **91**: 694–703.
- [21] HOFMANN K, STOFFEL W. TMbase – A database of membrane spanning proteins segments *Biol Chem. Hoppe-Seyler* 1993; **374**: 166.
- [22] HORSTKORTE R, MUHLENHOFF M, REUTTER W, NOHRING S, ZIMMERMANN-KORDMANN M, GERARDY-SCHAHN R. Selective inhibition of polysialyltransferase ST8SiaII by unnatural sialic acids. *Exp Cell Res* 2004; **298**: 268–274.
- [23] HUERTA S, SRIVATSAN ES, VENKATESAN N, PETERS J, MOATAMED F, RENNER S, LIVINGSTON EH. Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. *Surgery* 2001; **130**: 834–843.
- [24] JESSEN U, NOVITSKAYA V, PEDERSEN N, SERUP P, BEREZIN V, BOCK E. The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritegenesis in PC12 E2 cells. *J Neurochem* 2001; **79**: 1149–1160.

- [25] JOHNSON CP, FUJIMOTO I, PERRIN-TRICAUD C, RUTISHAUSER U, LECKBAND D. Mechanism of homophilic adhesion by the neural cell adhesion molecule: use of multiple domains and flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6963–6968.
- [26] JULENIUS K, MOLGAARD A, GUPTA R, BRUNAK S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 2005; **15**: 153–164.
- [27] KISELYOV VV, SKLADCHIKOVA G, HINSBY AM, JENSEN PH, KULAHIN N, SOROKA V, PEDERSEN N, TSETLIN V, POULSEN FM, BEREZIN V, BOCK E. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure (Camb)*. 2003; **11**: 691–701.
- [28] KOLKOVA K, NOVITSKAYA V, PEDERSEN N, BEREZIN V, BOCK E. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 2000; **20**: 2238–2246.
- [29] KYTE J, DOOLITTLE RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; **157**: 105–132.
- [30] LIEDTKE S, GEYER H, WUHRER M, GEYER R, FRANK G, GERARDY-SCHAHN R, ZAHNINGER U, SCHACHNER M. Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* 2001; **11**: 373–384. Erratum w: *Glycobiology* 2001; **11**: 30G–31G.
- [31] ONG E, SUZUKI M, BELOT F, YEH JC, FRANCESCHINI I, ANGATA K, HINDSGAUL O, FUKUDA M. Biosynthesis of HNK-1 glycans on O-linked oligosaccharides attached to the neural cell adhesion molecule (NCAM): the requirement for core 2 beta 1,6-N acetylglucosaminyltransferase and the muscle-specific domain in NCAM. *J Biol Chem* 2002; **277**: 18182–18190.
- [32] PARATCHA G, LEDDA F, IBANEZ CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003; **113**: 867–879.
- [33] PERSSON B, ARGOS P. Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. *J Protein Chem* 1997; **16**: 453–457.
- [34] ROST B, YACHDAV G, LIU J. The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: W321–326.
- [35] ROUGON G, HOBERT O. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu Rev Neurosci* 2003; **26**: 207–238.
- [36] SAHARA N, TAKESHITA A. Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 61–65.
- [37] SARIOLA H, SAARMA M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003; **116**: 3855–3862.
- [38] SUZUKI M, ANGATA K, NAKAYAMA J, FUKUDA M. Polysialic acid and mucin type o glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J Biol Chem* 2003; **278**: 49459–49468.
- [39] TUSNADY GE, SIMON I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 2001; **17**: 849–850.
- [40] VAWTER MP, FRYE MA, HEMPERLY JJ, VANDERPUTTEN DM, USEN N, DOHERTY P, SAFFELL JL, ISSA F, POST RM, WYATT RJ, FREED WJ. Elevated concentration of N-CAM VASE isoforms in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2000; **34**: 25–34.
- [41] VAWTER MP. Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 2000; **405**: 385–395.
- [42] ŻEROMSKI J, JENEK R, NIEMIR Z, LIEBERT W. CD56 (N-CAM) antigen and mRNA expression in human endocrine glands. W: *Progress in Basic and Clinical Immunology* [red.] Mackiewicz A, Kurpisz M, Żeromski *J Adv Exp Med Biol* v. 495, Kluwer Acad Publ NY 2001; 336–339.
- [43] ŻEROMSKI J, NYCZAK E, DYSZKIEWICZ W. Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39** Suppl 2: 36–37.
- [44] ŻEROMSKI J. Miejsce i rola molekuly CD56/NCAM w biologii i medycynie. *Post Biol Kom* 2000; **4**: 599–608.
- [45] ŻEROMSKI J, SZCZEPAŃSKI M, MOZER-LISEWSKA I. Obecność antygeny CD56/NCAM w układzie nerwowym, odpornościowym i gruczołach dokrewnych – przypadkowa zbieżność? *Endokrynol Pol* 2005; **1**: 78–82.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 05.08.2005 r.

Przyjęto: 20.11.2005 r.

ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

E.mail: markacz@amp.edu.pl

INFORMACJE O NOWYCH KSIĄŻKACH

Ukazał się podręcznik autorstwa Zofii Bielańskiej Osuchowskiej pt. **ZARYS ORGANOGENEZY – Różnicowanie się komórek w narządach**, wydany przez Wydawnictwo Naukowe PWN SA (Warszawa, 2004).

Jest to podręcznik embriologii szczegółowej, przystępnie napisany i bogato ilustrowany. Omówiono w nim zarówno zmiany morfologiczne, jak i molekularne procesu różnicowania się narządów u ptaków i ssaków. W książce zostały opisane:

- nowoczesne metody badań embriologicznych
- mechanizmy gastrulacji i rozwój narządów pierwotnych
- początkowy rozwój układu nerwowego
- komórki grzebienia nerwowego
- różnicowanie się i rozwój kończyn u ssaków i ptaków
- rozwój układów krwionośnego i limfatycznego
- rozwój przewodu pokarmowego
- gruczoły przewodu pokarmowego
- rozwój układu oddechowego
- jamy ciała i krezki
- narządy wydalnicze
- rozwój narządów płciowych, gruczołów dokrewnych i powłoki zewnętrznej.

Ukazał się również **SŁOWNIK BIOLOGII KOMÓRKI** poświęcony pamięci Profesor Haliny Krzanowskiej, wydany przez Polską Akademię Umiejętności (Kraków 2005).

Autorami słownika jest 37 osób wysoko cenionych w zakresie wiedzy o biologii komórki. Recenzentami słownika byli: prof. dr hab. Maria J. Olszewska oraz prof. dr hab. Szczepan Biliński.

Ukazanie się słownika było możliwe dzięki kompetentnej i ścisłej współpracy autorów i redaktorów, żmudnej pracy redaktorów technicznych: Elżbiety Kołaczkowskiej i Jacka Goduli oraz dużej życzliwości Wydawcy.

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

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/yegz./kmpł, „Postępów Biologii Komórki”.

Kwotęzłoty (słownie złotych)

Przekazaliśmy na Wasze konto dnia

Nasz NIP.....

Jednocześnie upoważniamy do wystawienia faktury bez potwierdzającego odbiór podpisu odbiorcy.

(pieczętka imienna i podpis zamawiającego)

KOMUNIKATY

Zakład Cytologii Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski oraz Oddział Warszawski Towarzystwa Biologii Komórki zapraszają na organizowany po raz drugi LETNI KURS HODOWLI KOMÓREK ZWIERZĘCYCH.

Zajęcia odbędą się w dniach od 12 do 14 oraz od 14 do 16 czerwca 2006 roku. Program kursu będzie obejmował zajęcia teoretyczne oraz praktyczne. W ramach zajęć praktycznych Uczestnicy będą mogli zapoznać się z następującymi metodami:

1. Hodowla ustalonych linii komórkowych (hodowle komórek adherentnych i rosnących w zawiesinie).
2. Hodowla mioblastów mysich.
3. Hodowla komórek nowotworowych.
4. Przestrzenna hodowla komórek.
5. Uzyskiwanie zarodkowych komórek macierzystych.
6. Hodowla pierwotna komórek kanalików nerkowych.

Wykłady będą dotyczyły metod prowadzenia hodowli komórkowych, organizacji pracowni, zakładania hodowli pierwotnych, wyprowadzania linii komórkowych, mikroskopii konfokalnej, sposobów analizy i dokumentacji wyników. Dodatkowo odbędzie się prezentacja sprzętu oraz odczynników do hodowli komórek. Zorganizowana zostanie również sesja, na której Uczestnicy będą mogli zaprezentować własne wyniki badań.

Szczegółowe informacje dotyczące kursu będą umieszczane na stronie: www.biol.uw.edu.pl/cytologia. Zgłoszenia należy przesyłać (do końca stycznia 2006) na adres: hodowla@biol.uw.edu.pl lub: Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa (formularz zgłoszenia w załączeniu obok).

Formularz zgłoszeniowy
LETNI KURS HODOWLI KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

imię i nazwisko:

miejsce pracy:

adres:

telefon:

email:

kurs w dniach 12-14.06.2006: TAK NIE

kurs w dniach 14-16.06.2006: TAK NIE

zakwaterowanie: TAK NIE

abstrakt (opcjonalnie):

Warszawski Oddział Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki
Polskie Towarzystwo Anatomów
Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików

organizuje konferencję naukową pt. „*Do czego potrzebna jest fuzja*”?

Konferencja odbędzie dn. 4 lutego 2006 w godzinach 11–16 na Wydziale Biologii UW. Program Konferencji

1. Otwarcie konferencji – prof J. Moraczewski
2. Organizacja główek fosfatydylocholino w błonie a oddziaływanie między błonami – prof. S. Przystański i dr J. Hładyszowski
3. Mechanizm fuzji osłon wirusowych z błonami komórkowymi – prof. A. Piekarczyk
4. Transport endocytotyczny – fuzje błon – dr hab. W. Kłopotka
5. Fuzja prekursorów osteoblastów – prof. K. Włodarski
6. Fuzja mioblastów – dr E. Brzońska
7. Fuzja gamet ssaków podczas zapłodnienia – prof. M. Maleszewski.

Szczegółowe informacje dotyczące konferencji znajdują się na stronie:

<http://www.biol.uw.edu.pl/cytologia>

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 B₃.

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

Cennik dla Autorów w 2006 r.

	odbitek 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
 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:

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.

Wieloletni... 2010

Wieloletni... 2010

Wieloletni... 2010

Wieloletni... 2010

Wieloletni... 2010

Wieloletni... 2010

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi); 2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji); 3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s.295) 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 kolejny tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na 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 zmniejszania 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 I. 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,	
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	nie została wysłana do innej redakcji	<i>tak nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	<i>tak nie</i>

Odpowiadam za całość pracy opisanej w załączonym maszynopisie *tak nie*

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postępach” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. *podpisy wszystkich autorów*

TREŚĆ – CONTENT

W tym Zeszycie	591
KUŹNICKI L.: Aleksandra Przełęcka (25.XI.1920–18.09.2005)	593
BUKOWSKI R., PODLASZ P., WAŚOWICZ K.: Ptasie przeciwciała IgY – zalety i zastosowania – Avian antibodies IgY – advantages and applications	597
SOKOŁOWSKA K.: Regulacja łączności symplastowej w procesach wzrostu i rozwoju roślin Regulation of symplastic continuity in processes of growth and development in plants	603
JĘDRZEJCZAK M. S., KOWALSKI M.L.: Składanie RNA: formy alternatywne, regulacja i funkcje – Alternative splicing, mRNA variants, regulation and function.	617
KRZYŹOWSKA M.: Regulatorowa rola tlenu azotu w apoptozie Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis	633
TYLZANOWSKI P.: Gra w rękę – Sleight of hand	647
MACIEJEWSKA I., BEREZNOWSKI Z.: Wybrane aspekty powstawania organicznej macierzy mineralizowanych tkanek zęba oraz zmiany jej fizjologii spowodowane wpływem endogennej profilaktyki fluorkowej. Część I. Szklivo The aspects of the formation of extracellular matrix in mineralized tissues including the disturbances caused by fluoride. Part I. Enamel	661
MACIEJEWSKA I., BEREZNOWSKI Z.: Wybrane aspekty powstawania organicznej macierzy mineralizowanych tkanek zęba oraz zmiany jej fizjologii spowodowane wpływem endogennej profilaktyki fluorkowej. Część II. Zębina The aspects of the formation of extracellular matrix in mineralized tissues including the disturbances caused by fluoride. Part II. Dentin	671
STAWSKI K., DĄBROWSKA G., GOC A.: Współzależność pomiędzy metylacją cytozyny i modyfikacjami chromatyny Interrelationship between cytosine methylation and chromatin modification	679
JETHON Z., MURAWSKA-CIAŁOWICZ E., DZIĘGIEL P., PODHORSKA-OKOŁÓW M.: Udział białek stresowych w adaptacji wysiłkowej Stress proteins in exercise adaptation	697
KRSZYNA K., STOKŁOSA T.: Czynniki indukowane przez hipoksję-1 (HIF-1): Budowa, regulacja ekspresji, funkcja oraz rola w progresji nowotworów Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): Structure, regulation of expression, function and the role in tumor progression	707
KACZMAREK M., SZCZEPAŃSKI M., ŻEROMSKI J.: Zastosowanie narzędzi bioinformatycznych w badaniu struktury i ekspresji genu oraz budowy i funkcji białka na przykładzie cząsteczki NCAM Application of bioinformatic tools for the assessment of gene and protein structure and function: NCAM molecule as an example	729
Informacja o nowych książkach	743
Oferta wydawnicza	744
Komunikaty	746
Wskazówki dla autorów i warunki prenumeraty	749