

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 33, ISSUE 4/2006  
(589–795)

# Postępy Biologii Komórki

# Advances in Cell Biology

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Ministerstwa Edukacji i Nauki.

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 Ministry of Education and Science.

Redaguje Kolegium – Editors:

Lilla HRYNIEWIECKA – *energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria* – Zakład Bioenergetyki, Coll. Biologicum, Uniwersytet Adama Mickiewicza, 61-614 Poznań, ul. Umultowska 89,  
Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – *neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology* – Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3  
[bozenakk@nencki.gov.pl](mailto:bozenakk@nencki.gov.pl)

Jerzy KAWIAK – *immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology* – Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99  
[jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)

Wincenty KILARSKI – *mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements* – Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6 [kilar@zok.iz.uj.edu.pl](mailto:kilar@zok.iz.uj.edu.pl)

Janusz KUBRAKIEWICZ – *biologia rozwoju, embriologia, różnicowanie komórek, cytoszkielet – developmental biology, embryology, cell differentiation, cytoskeleton* – Instytut Zoologiczny UW, 50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21 [jkubrak@biol.uni.wroc.pl](mailto:jkubrak@biol.uni.wroc.pl)

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 [olszewsk@biol.uni.lodz.pl](mailto:olszewsk@biol.uni.lodz.pl)

Barbara PŁYTYCZ – *immunologia – immunology* – Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6  
[PLYT@zok.iz.uj.edu.pl](mailto:PLYT@zok.iz.uj.edu.pl)

Maciej ZABEL – *histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybrydocytochemistry), cell ultrastructure* – Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a  
[mazab@amp.edu.pl](mailto:mazab@amp.edu.pl)

Jan ŻEROMSKI – *patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry* – Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49 [jzeromski@amp.edu.pl](mailto:jzeromski@amp.edu.pl)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

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

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

**Indexed in:** Biosis, Philadelphia, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey.

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

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

Ark. wyd. 17,0. Ark. druk. 13. Podpisano do druku w listopadzie i druk ukończono w grudniu 2006 r.

## W tym Zeszytcie

U ssaków, w drodze ewolucji, został ukształtowany ekonomiczny system wytwarzający z jednej komórki – megakariocytu – od 4 do 8 tysięcy płytek. Czas życia płytek w krwiobiegach wynosi 9 do 12 dni, ale *in vitro* tylko ok. 2 dni. Widocznie płytki wymagają jakiegoś czynnika przeżycia, którego brak w pożywkach używanych do hodowli. Proces apoptozy w bezjądrowych płytkach budził kontrowersje, ale podobna sytuacja jest w przypadku bezjądrowych erytrocytów. Jądro komórkowe nie jest niezbędne do indukcji procesu apoptozy. Markery apoptozy w płytkach krwi opisali Autorzy w artykule na stronie 603.

Mechanizmy odporności nieswoistej są pierwszą, a u większości organizmów jedyną linią obrony przeciw patogennym drobnoustrojom. Działanie tych mechanizmów zaczyna się od rozpoznania charakterystycznego wzoru molekularnego związanego z patogenem (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) przez białka zawierające powtórzenia bogate w leucynę (LRR). Roślinne białka „R” swoicie rozpoznają patogeny pochodzenia grzybowego, bakteryjnego oraz wirusowego. Zwierzęcymi białkami rozpoznającymi PAMP są receptory Toll-podobne wiążące domeny LRR cząsteczek patogena (o receptorach Toll-podobnych patrz też „Postępy Biologii Komórki” 2006; 33, 247–255). Odziaływania te prowadzą do reakcji nadwrażliwości w rejonie infekcji u roślin; u zwierząt do produkcji chemokin, cytokin, regulatorów transkrypcji i in. Białka rodziny NOD to ostatnio opisane wewnątrzkomórkowe receptory PAMP, które są omawiane w artykule na stronach 635–655.

Populację komórek macierzystych mających zdolność do różnicowania się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów oraz oligodendrocytów wyizolowano z ludzkiej krwi pępowinowej. Namnażanie komórek tej populacji w obecności EGF i ich wielokrotne pasażowanie umożliwiło otrzymanie stabilnej, klonogennej linii neuralnych komórek macierzystych. Więcej na temat tych komórek znajdzie Czytelnik na stronach 667–681.

W dwu kolejnych artykułach Autorzy omawiają „Wielkość genomów jądrowych i komórek u zwierząt” (strona 721) oraz „Ewolucję rozmiarów genomów jądrowych u roślin okrytozalążkowych” (strona 737). Wielkości genomów jądrowych zwierząt, jak i roślin różnią się tysiące razy i zupełnie nie koreluje to ze stopniem złożoności organizmów. Wynika to stąd, że większość genomu stanowią niekodujące sekwencje powtarzalne. Przedstawiono hipotezy na temat powstawania tak dużego zróżnicowania ilości niekodującego DNA. Sugeruje się, że w odległej przeszłości następowała poliploidyzacja genomów. Znaczne różnice rozmiarów genomów są spowodowane głównie przez odmienną liczbę rund duplikacji u przodków oraz inwazję retroelementów. Warto przeczytać te dwa artykuły razem dla poszerzenia ogólnej wiedzy z zakresu biologii komórki.



## WYSTĘPOWANIE, BIOSYNTeza I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA KWASU TRAUMATYNOWEGO U ROŚLIN\*

OCCURRENCE, BIOSYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF TRAUMATIC ACID IN PLANTS

Anna PIETRYCZUK, Romuald CZERPAK

Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

*Streszczenie:* Kwas traumatynowy – *trans*-2-dodeceno-1,10-dikarboksylowy (TA) – jest syntetyzowany w tkankach roślin z nienasyconych kwasów tłuszczowych: linolenowego (18:3) i linolowego (18:2) w odpowiedzi na zranienie przez fitofagi lub patogeny. Kluczowymi enzymami szlaku biosyntezy TA są lipoksygenazy (LOXs) i liaza wodoronadtlenkowa (HPL). Z przeprowadzonych badań wynika, że związek ten ma właściwości stymulujące podziały komórkowe i tworzenie tkanki gojącej (kalusa) oraz wzrost zawartości barwników fotosyntetycznych, monosacharydów i białek w komórkach roślin. Molekularne mechanizmy działania TA oraz jego wpływ na procesy metaboliczne roślin nie zostały dotychczas poznane. Wiadomo jedynie, że indukuje on fosforylację reszt tyrozynowych białek o masach molekularnych 19, 20, 22, 26, 31, 42 i 74 kDa.

*Słowa kluczowe:* kwas traumatynowy, traumatyna, lipoksygenazy, liaza wodoronadtlenkowa, zranienie.

*Summary:* Traumatic acid – *trans*-2-dodecenedioic acid – is synthesized in plant tissues from polyunsaturated fatty acids, linolenic (18:3) and linoleic (18:2) in response to wounding, pathogenes attack and herbivores. The key enzymes in the biosynthesis pathway of TA are lipoxygenases (LOXs) and hydroperoxide lyase (HPL). From the numerous investigations it appears that this compound stimulates the cell divisions, wound healing and callus formation. Moreover, TA causes the increase of the content of photosynthetic pigments, monosaccharides and water-soluble proteins in plants' cells. Molecular mechanisms of the activity of TA and its influence on plants' metabolic processes haven't been recognized till now. It is only known that TA induces the tyrosine phosphorylation of proteins with molecular weights 19, 20, 22, 26, 31, 42 and 74 kDa.

*Key words:* traumatic acid, traumatin, lipoxygenases, hydroperoxide lyase, wounding.

*Wykaz skrótów:* **ABA** – kwas abscysynowy, **AOS** – dehydrataza wodoronadtlenkowa, **HPL** – liaza wodoronadtlenkowa, **(13S)-HPOD** – kwas 13-hydroperoksylinolowy, **(13S)-HPOT** – kwas 13-hydro-

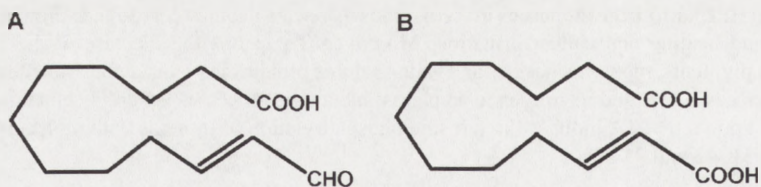
\*Praca została dofinansowana ze środków Uniwersytetu w Białymstoku.

peroksylinolenowy, **JA** – kwas jasmonowy, **LOX** – lipoksygenaza, **ODA** – kwas 10-oksy-*trans*-8-dekanowy, **12-oksy-PDA** – kwas 12-oksy-fotodienowy, **PIN II** – gen inhibitora proteinaz **II**, **SA** – kwas salicylowy, **STS** – tiosiarczan srebra, **TA** – kwas traumatynowy, **trans-10-ODA** – kwas 12-oksy-*trans*-10-dodekanowy (traumatyna).

## 1. WSTĘP

Poza naturalnie występującymi cytokininami będącymi pochodnymi adeniny, właściwości cytokinin wykazują niektóre pochodne mocznika, np. 1,3-difenylococznik, 5-ureidohydantoina, zwana alantoiną, a także związki o zupełnie odmiennej budowie chemicznej, jak kwas traumatynowy (TA) i traumatyna o właściwościach cytokinino-podobnych. Kwas traumatynowy, czyli *trans*-2-dodeceno-1,10-dikarboksylowy i jego forma aldehydowa, tj. kwas 2-dodeceno-1-al-10-karboksylowy, zwany traumatyną, należą do pochodnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (ryc. 1). Hormony te zostały po raz pierwszy wyizolowane z niedojrzałych strąków fasoli w latach 1937–1938 przez Bonnera i Englisha [8, 9]. Nazwano je hormonami przyrannymi, gdyż pojawiają się wokół zranienia i pobudzają podziały komórek w tkance gojącej, zwanej kalusem. Okazało się, że traumatyna u roślin naczyniowych jest związkiem bardziej aktywnym biologicznie niż kwas traumatynowy.

Obecność traumatyny wykazano u wielu gatunków roślin, głównie w młodych rozwijających się liściach, owocach i nasionach. Młode strąki fasoli (*Phaseolus vulgaris*) są jednym z najbogatszych źródeł traumatyny i kwasu traumatynowego. Również u glonów kwas traumatynowy działa stymulująco na podziały komórek i ich procesy metaboliczne. Wraz ze starzeniem się roślin następuje przekształcanie traumatyny i jej kwasu w formę estrową, nieaktywną biologicznie. Kwas traumatynowy i traumatyna są intensywnie syntetyzowane przez rośliny jako odpowiedź na zranienie najczęściej spowodowane przez fitofagi lub patogeny. W ostatnich latach Mau i współaut. [22] i Champavier i współaut. [5] wykryli związki pokrewne z traumatyną, takie jak: kwas 10-oksy-*trans*-8-dekanowy (ODA) i 1-okten-3-ol jako produkt uboczny w biosyntezie ODA w trzonach grzybów, między innymi pieczarki (*Agaricus bisporus*). Związki te działają stymulująco na wzrost grzybów i ich metabolizm.



RYCINA 1. Struktura chemiczna traumatyny (A) i kwasu traumatynowego (B) [3, 12, 14]

Dotychczasowe badania wskazują na to, że traumatyna i związki pokrewne dość powszechnie występują w świecie roślin naczyniowych i niższych, takich jak: grzyby i być może glony i prawdopodobnie współdziałają z innymi fitohormonami w stymulacji wzrostu, adaptacji do stresów i regulacji wielu procesów fizjologiczno-metabolicznych.

## 2. WYSTĘPOWANIE

Kwas traumatynowy, *trans*-2-dodeceno-1,10-dikarboksylowy, został po raz pierwszy wyizolowany ze strąków niedojrzałej fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) przez Englisha i Bonnera w 1937 roku i nazwany hormonem przyrannym, powodującym intensywne podziały komórkowe i tworzenie tkanki gojącej [8, 9]. W latach późniejszych w wyniku badań przeprowadzonych przez Zimmermana i Coudrona stwierdzono, że właściwym hormonem przyrannym jest traumatyna (kwas 12-*oxo-trans*-10-dodekanowy), a TA jest tylko produktem jej nieenzymatycznego, spontanicznego utlenienia [37].

Obecność traumatyny i kwasu traumatynowego została dotychczas stwierdzona w tkankach wielu gatunków roślin. W największych ilościach związek ten jest syntetyzowany w odpowiedzi na zranienie. Główny enzym szlaku biosyntezy traumatyny, liaza wodoronadtlenkowa (HPL), został zidentyfikowany i wyizolowany z tkanek różnych gatunków roślin [12, 14]. Powszechnie występują też związki będące ubocznymi produktami szlaku biosyntezy traumatyny: 6-węglowe, lotne aldehydy: heksanal i (2E)-heksanal, które są powszechnie nazywane „aldehydami liści” [6, 12, 14].

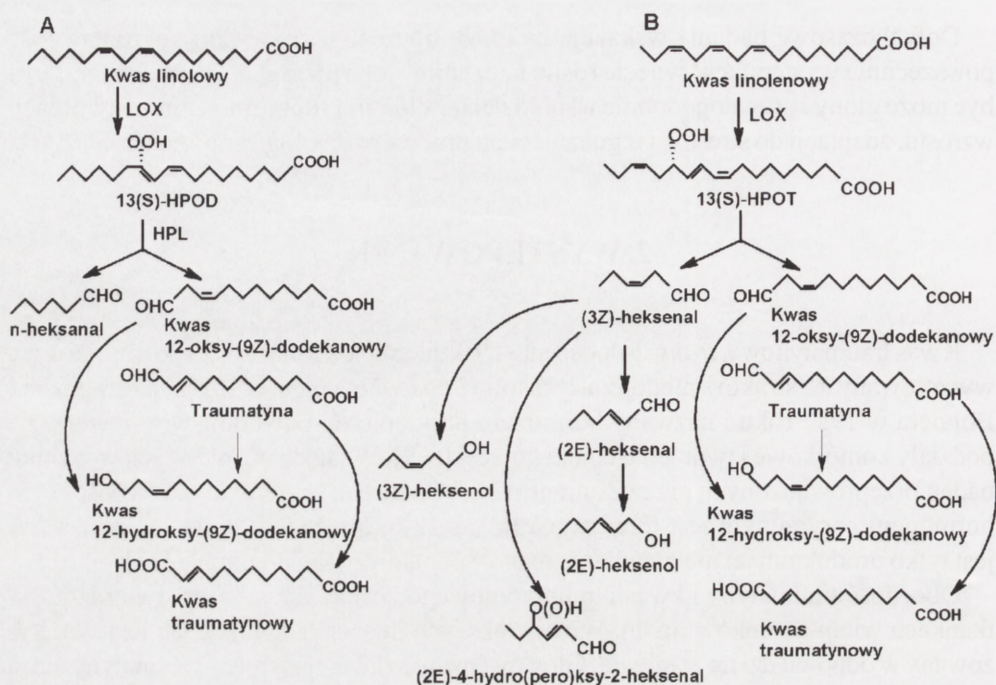
Wykazano, że w największych ilościach traumatyna występuje w młodych, intensywnie rosnących organach, takich jak: liście, owoce i nasiona. Wraz z wiekiem rośliny następuje stopniowe przekształcanie wolnego kwasu w jego formę estrową, która jest nieaktywna biologicznie [37].

Ponadto kwas 10-*oksy-trans*-8-dekanowy (ODA), mający aktywność biologiczną analogiczną do roślinnej traumatyny, jest jednym z kilku dobrze poznanych stymulatorów wzrostu u grzybów [5].

## 3. BIOSYNTENZA

Z dotychczasowych badań nad szlakiem biosyntezy TA u roślin, wiadomo, że prekursorem tego związku są 18-węglowe, nienasycone kwasy tłuszczowe: kwas linolenowy (18 : 3,  $\Delta$ 9, 12, 15) i linolowy (18 :2,  $\Delta$ 9, 12) (ryc. 2). Kwasy te są uwalniane z frakcji lipidów błon cytoplazmatycznych w wyniku działania fosfolipaz typu A2 i D, które są aktywowane w odpowiedzi na zranienie roślin [16].

Badania molekularne dowiodły, że głównymi enzymami zaangażowanymi w szlak biosyntezy TA są lipoksygenazy (LOX) i liaza wodoronadtlenkowa (HPL) [3, 11, 13, 14, 15, 28, 35].



RYCINA 2. Szlaki biosyntezy traumaty i kwasu traumatynowego z kwasu linolowego (A) i linolenowego (B) [3, 12] [zmodyfikowany]

Uwalniane z frakcji lipidów błonowych pod wpływem czynnika stresowego, najczęściej zranienia, nienasycone kwasy tłuszczowe ulegają reakcji utlenienia katalizowanej przez lipoksygenazy [3,11]. Enzymy te (EC 1. 13. 11. 12) występują w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych. Katalizują one reakcję przyłączania tlenu molekularnego do nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jest to pierwszy etap biosyntezy traumaty w roślin [7, 11, 12, 14]. W ostatnich latach wyizolowano cDNA i określono sekwencję aminokwasów lipoksygenaz u wielu gatunków roślin. Zidentyfikowane zostały trzy klasy tych enzymów: LOX1, LOX2 i LOX3, które kodowane są przez trzy podrodziny genów, nazwanych odpowiednio: *lox1*, *lox2* i *lox3*. Ekspresja genów *lox* jest organozależna. Okazało się, że geny *lox1* ulegają ekspresji głównie w łodygach i korzeniach, *lox2* w liściach, a *lox3* w liściach i korzeniach roślin. Analiza produktów reakcji kontrolowanych przez wszystkie trzy klasy LOXs dowiodła, że LOX1 katalizuje reakcje, których głównym produktem są kwasy 9-hidroperoksy-tłuszczowe. Kwasy: 13-hidroperoksylinolenowy (13-HPOT) i 13-hidropeoksylinolowy (13-HPOD), które są prekursorami traumaty, są produktami reakcji utleniania odpowiednio kwasu linolenowego i linolowego katalizowanych przez LOX2 i LOX3 [28].

Kolejnym etapem biosyntezy traumaty jest reakcja katalizowana przez HPL (liazę wodoronadtlenkową). W wyniku tej reakcji 18-węglowy łańcuch 13-HPOT lub 13-HPOD zostaje rozszczepiony na 6-węglowe aldehydy: (2E)-heksenal lub heksanal oraz 12-węglowy kwas 12-okso-(9Z)-dodekanowy, który w wyniku reakcji izomeryzacji



ulega przekształceniu do kwasu 12-okso-(10E)-dodekanowego – traumatyny [3, 14, 15, 32]. Następnie w latach osiemdziesiątych dowiedziono, że nieenzymatyczna auto-oksydacja traumatyny prowadzi do powstania TA [37].

HPL została po raz pierwszy wyizolowana z siewek arbuza [35]. Następnie enzym ten został zidentyfikowany w tkankach wielu gatunków roślin, m.in. w owocach pomidora, ogórka, papryki, liściach herbaty, rzodkiewnika i pomidora [3, 12, 14, 17, 19, 20, 21]. Badania molekularne wykazały, że wszystkie enzymy HPL należą do rodziny enzymów cytochromowych P450 [3, 14, 15]. Stwierdzono, że enzym ten jest związany bezpośrednio z zewnętrzną błoną chloroplastów [4] i jest najbardziej aktywny w miękiszu fotosyntezującym. Eksperymentalnie dowiedziono, że aktywność HPL zależy od zawartości chlorofilu i spada wraz z obniżaniem stężenia tego barwnika w tkankach [18]. O korelacji aktywności enzymu HPL z zawartością chlorofilu w tkankach roślinnych świadczy również to, że lotne aldehydy, będące produktami ubocznymi w reakcji katalizowanej przez HPL, w największych ilościach wytwarzane są przez zielone liście [14].

Traumatyna może być również przekształcana do innej pochodnej, tj. 9-hydroksytraumatyny. Gardner [10] stwierdził, że związek ten powstaje w wyniku reakcji utleniania traumatyny, katalizowanej przez lipoksygenazę lub peroksygenazę. Natomiast Stelt i współaut. [32] uzyskali 9-hydroksytraumatynę poprzez inkubację 13-HPOD lub 13-HPOT z HPL, bez obecności lipoksygenazy. Zasugerowali oni, że związek ten może powstawać w wyniku przekształcenia albo nieenzymatycznego, albo z udziałem HPL, która ma aktywność monooksygenazy, podobnie jak większość enzymów z rodziny cytochromów P450.

Wyniki innego eksperymentu [24] wydają się być potwierdzeniem tezy, że lipoksygenaza nie uczestniczy w procesie utleniania traumatyny. Podczas inkubacji traumatyny z aktywną i zdenaturowaną LOX w buforach o różnym pH zauważono, że 9-hydroksytraumatyna produkowana jest w takich samych ilościach w obecności lub przy braku LOX w mieszaninie reakcyjnej. Podczas trwania tego eksperymentu wykazano obecność jeszcze innej pochodnej traumatyny – kwasu 12-oksy-11-hydroksy-(10E)-dodekanowego (11-hydroksytraumatyny), którego ilość była około 5-krotnie mniejsza niż 9-hydroksytraumatyny [24].

Intensywność reakcji w procesie biosyntezy traumatyny u roślin jest regulowana przez wiele czynników zewnętrznych, takich jak: zranienie, atak roślinożerców lub patogenów, dotyk, szok osmotyczny, UV, susza, a także wewnętrznych (ryc. 3).

Wydaje się, że głównym punktem kontrolnym w biosyntezie traumatyny jest regulacja aktywności fosfolipaz, które uwalniają nienasycone kwasy tłuszczowe z frakcji lipidów błonowych komórek roślinnych. Wykazano, że aktywność tych enzymów wzrasta gwałtownie w odpowiedzi na wzmożone działanie czynnika stresowego [15].

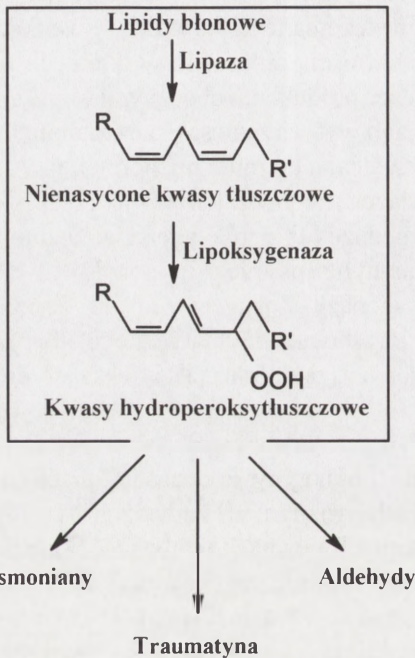
Badania molekularne wykazały, że w odpowiedzi na zranienie liści ziemniaka następuje w nich gwałtowny wzrost transkrypcji genów LOX2 i LOX3. Szczegółowe badania dowiodły, że wzrost akumulacji mRNA *lox3* osiąga maksymalną wartość po 30 minutach od zranienia, natomiast poziom mRNA *lox2* wzrasta ciągle, aż do 24 godzin od momentu zadziałania czynnika stresowego. Jednak wzmożona transkrypcja mRNA *lox3* dłużej wraca do podstawowego poziomu [28].

**CZYNNIKI****ZEWNĘTRZNE**

Roślinożercy / zranienie  
 Atak patogenów  
 Dotyk  
 Szok osmotyczny  
 Susza  
 UV

**WEWNĘTRZNE**

Rozwój pyłku  
 Starzenie się (?)  
 Kwitnienie (?)  
 Magazynowanie



RYCINA . 3. Wpływ różnych czynników wewnętrznych i zewnętrznych środowiska na biosyntezę traumatyny u roślin [15] [zmodyfikowany]

English i Bonner w roku 1937 [8] po raz pierwszy wyizolowali ze strąków niedojrzałej fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) TA jako hormon przyranny, powodujący intensywne podziały komórek i ich elongację [8, 9]. Zauważyli oni, że wyizolowana substancja jest monokarboksylovym kwasem, który po pewnym czasie przekształca się w kwas dikarboksylovym, o mniejszej aktywności biologicznej [8]. Obecnie wiadomo, że właściwym hormonem przyrannym produkowanym bezpośrednio po zranieniu jest traumatyna, która, jak udowodniono, ma większą aktywność biologiczną niż TA [37].

Okazało się, że TA dodany do kultur różnych gatunków jednokomórkowych glonów powodował ponad dwukrotny wzrost liczby komórek w porównaniu z kontrolą [25]. Eksperymentalnie wykazano również [34], że TA może powodować intensywne podziały komórkowe i tworzenie tumorów w owocach pomidora.

Badania z ostatnich lat wykazały, że zranienie powoduje również ekspresję genów HPL w pomidorze [15] i *Arabidopsis thaliana* [3]. Ponadto intensywne uwalnianie lotnych aldehydów, będących ubocznymi produktami działania HPL, jest ściśle związane z procesem niszczenia tkanki roślinnej [3]. Związki te produkowane są intensywnie przez rośliny również w odpowiedzi na atak patogenów i stymulują produkcję fitoaleksyn [36].

Nieco inaczej przebiega szlak biosyntezy ODA u grzybów. Kwas linolowy jest utleniany przy udziale LOX do kwasu 10-(S)-HPOD, który następnie ulega rozszczepieniu przez wiązkę wodoronadtlenkową na ODA i nienasycony alkohol 1-okten-3-ol. U grzybów stwierdzono również występowanie 13-HPOD, ale przypuszczalnie pochodzi on z konkurencyjnego szlaku metabolicznego [1].

#### 4. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Już w XIX wieku zauważono, że uszkodzona tkanka jest pobudzana do intensywnych podziałów i tworzenia tkanki gojącej (kalusa).

W doświadczeniu wykonanym na rączniku (*Ricinus communis*) wykazano, że międzywęzła roślin potraktowane egzogennym TA charakteryzowały się znacznie większym wzrostem w porównaniu z kontrolnymi (bez dodatku hormonu). Podobny efekt, stymulację podziałów komórkowych międzywęzli, uzyskano nakłuwając je samą sterylną igłą. Najprawdopodobniej spowodowane to jest działaniem endogennego TA, który jest syntetyzowany w odpowiedzi na zranienie tkanki międzywęzła [29].

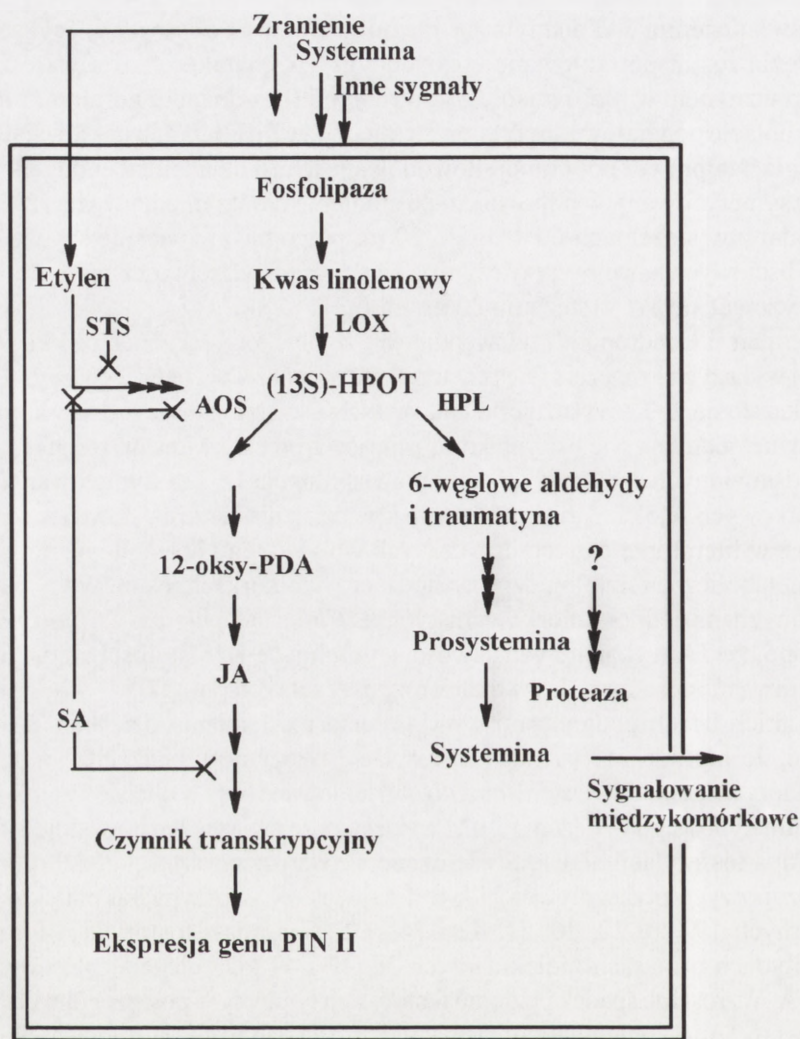
TA dodany w stężeniach od 1  $\mu\text{g}$  do 20  $\mu\text{g}$  powodował znacznie szybszy wzrost ogonków liściowych bawełny, przy czym najsilniejszymi właściwościami stymulującymi charakteryzował się TA w stężeniu 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  [33].

Zimmerman i Coudron [37] udowodnili zaś, że hipokotyl sadzonek ogórka (*Cucumis sativus* L.) wykazywał znacznie większy wzrost w obecności egzogenego *trans*-10-ODA. Ponadto okazało się, że TA wykazuje nie tylko właściwości stymulujące podziały komórkowe, ale jest również jednym z wielu czynników inicjujących proces kwitnienia roślin [12, 14].

Z przedstawionych danych wynika, że główną funkcją TA jest stymulowanie podziałów komórkowych. Molekularny mechanizm jego działania nie został dotychczas poznany. Nie ma też w literaturze danych dotyczących wpływu tego hormonu na podstawowe procesy metaboliczne i fizjologiczne zachodzące w komórkach roślin. W wyniku badań prowadzonych na jednokomórkowym glonie, *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyceae*), stwierdzono, że TA wykazuje właściwości stymulujące wzrost ilości chlorofilu *a* i *b*, karotenoidów, monosacharydów i białek rozpuszczalnych [26, 27].

W ostatnich latach podjęto próby wyjaśnienia mechanizmu działania TA [2, 31]. Wykazano, że hormon ten wzmaga fosforylację tyrozyny w białkach. Na podstawie badań, w których kielki grochu (*Pisum sativum*) hodowane były w obecności egzogenego kwasu traumatynowego w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  wykazano, że związek ten powoduje 1,5-krotny wzrost tempa fosforylacji białek. Stwierdzono, że wzrost zawartości ufosforylowanych reszt tyrozynowych pod wpływem TA jest największy w przypadku białek o masach molekularnych 19, 20, 22, 26, 31, 42 i 74 kDa. Natomiast fosforylacja tyrozyny w makropeptydach o masach molekularnych 36, 47 i 49 kDa ulegała zahamowaniu po dodaniu TA. Wzrost lub spadek poziomu fosforylacji tyrozyny w poszczególnych białkach pod wpływem TA jest prawdopodobnie wynikiem oddziaływania hormonu na aktywność odpowiednich kinaz i fosfataz białkowych. Można przypuszczać, że połączenie się TA z receptorem w błonie komórkowej powoduje uaktywnienie odpowiedniej kinazy, co z kolei prowadzi do fosforylacji i zmiany konformacyjnej odpowiednich białek oraz uruchomienia dalszej kaskady przekazywania sygnałów w komórce [2].

Na podstawie badań nad mechanizmami obronnymi roślin w odpowiedzi na zranienie zaproponowano model ekspresji genów białek obronnych w pomidorze (*Lycopersicon esculentum*) (ryc. 4) [31]. Uszkodzenie tkanki roślinnej jest sygnałem aktywującym fosfolipazy błonowe. Uwolnione z frakcji lipidów błonowych nienasycone kwasy tłuszczowe są substratem dla LOX, a powstałe kwasy hydroperoksytłuszczowe mogą zostać przekształcone na dwóch szlakach. W jednym z nich w reakcji katalizowanej przez AOS powstaje kwas 12-oksy-fotodienowy (PDA), z którego w dalszym etapie tworzy się kwas jasmonowy (JA) indukujący ekspresję genów inhibitorów proteinaz II, które hamują aktywność enzymów hydrolizujących białko w przewodzie pokarmowym owada. Kwasy 13-HPOD i 13-HPOT mogą być wykorzystane również przez



RYCINA 4. Proponowany model indukcji genów białek obronnych w pomidorze (*Lycopersicon esculentum*) [31] [zmodyfikowany]. Na schemacie uwzględniono również działanie etylenu, który produkowany jest w odpowiedzi na zranienie i indukuje ekspresję genu *AOS*. STS i SA działają natomiast jako inhibitory ekspresji genów *AOS* i *PIN II*

HPL, co w efekcie prowadzi do powstania 6-węglowych aldehydów i traumatyny. Traumatina zaś indukuje ekspresję genów prosysteminy, która następnie zostaje przekształcona w systeminę – substancję sygnałową uczestniczącą w indukowanej odporności roślin [31].

Okazało się, że nie tylko mechaniczne uszkodzenie tkanki roślinnej jest sygnałem do uruchomienia szlaku biosyntezy traumatyny. Duże ilości tego hormonu oraz lotnych 6-węglowych aldehydów pojawiają się również w odpowiedzi na działanie innych

abiotycznych i biotycznych czynników stresowych, np. atak patogenów. Eksperymentalnie udowodniono, że heksanal i (2E)-heksenal mają właściwości grzybo- i bakterio-bójcze. W badaniach na *Pseudomonas syringae* var. *phaseolica* wykazano, że powodują one uszkodzenia struktury błon komórkowych, DNA, białek oraz zaburzają funkcjonowanie enzymów w komórkach mikroorganizmów. Podobnego efektu nie zaobserwowano jednak w przypadku TA, który wydaje się nie mieć właściwości bakterio-bójczych. Po potraktowaniu kultur bakterii różnymi stężeniami TA nie odnotowano istotnych różnic we wzroście kolonii mikroorganizmów w porównaniu z kontrolą [6].

Substancję o właściwościach podobnych do traumatyny zidentyfikowano również u grzybów, między innymi pieczarki. Kwas 10-oksy-*trans*-8-dekanowy (ODA) jest jednym z kilku dobrze poznanych stymulatorów wzrostu plechy grzybowej [5, 22, 23]. Aktywność biologiczna tego związku jest zbliżona do traumatyny. Mau i Beelman [23] wykazali, że szybkość wzrostu grzybni, a zwłaszcza owocnika *Agaricus bisporus* znacznie zwiększa się w obecności ODA.

Okazało się, że stężenie endogennego ODA u grzybów zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury i osiąga maksymalną zawartość przy 40°C. Dane te pozwalają wnioskować, że synteza ODA jest indukowana m.in. przez stresowy czynnik temperaturowy [5]. Podobne wyniki uzyskano także w badaniach nad lipoksygenazami u roślin naczyniowych, wykazując, że traumatyna może być syntetyzowana w odpowiedzi na działanie zbyt wysokiej lub niskiej temperatury [30].

## 5. PODSUMOWANIE

Traumatyna i związki pokrewne wykazują właściwości cytokininopodobne i należą do naturalnie występujących fitohormonów, które podobnie jak jasmoniany syntetyzowane są z nienasyconych kwasów tłuszczowych: linolowego i linolenowego. Aktualnie znane są dwa niezależne szlaki ich biosyntezy, które nieco różnią się u grzybów w porównaniu z roślinami naczyniowymi.

Biologiczna aktywność traumatyny u roślin na poziomie molekularnym została poznana w znikomym stopniu. Z dotychczasowych badań wiadomo, że kwas traumatynowy (TA) wzmacnia aktywność kinaz powodujących fosforylację reszt tyrozynowych w białkach, które odgrywają istotną rolę w regulacji wielu procesów fizjologiczno-metabolicznych. Również stwierdzono, że traumatyna aktywuje mechanizmy obronne roślin w odpowiedzi na zranienie przez fitofagi lub patogeny. Uszkodzenie tkanki roślinnej jest sygnałem aktywującym fosfolipazy błonowe, a w efekcie powoduje indukcję ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę systeminy – substancji sygnałowej w indukowanej odporności roślin. Badania ostatnich kilkunastu lat wykazały, że wzrost zawartości traumatyny w roślinach naczyniowych i grzybach może być spowodowany nie tylko urazami mechanicznymi – zranieniami, ale także stresem temperaturowym uwarunkowanym zbyt wysokimi lub niskimi temperaturami, odbiegającymi od normy fizjologicznej. Dotychczas wykonano bardzo mało badań doświadczalnych dotyczących aktywności fizjologiczno-metabolicznej traumatyny i jej związków pokrewnych u roślin.

Jest duże prawdopodobieństwo, że traumatyna wraz z innymi fitohormonami, głównie JA i ABA, spełnia istotną rolę w mechanizmach adaptacyjnych i obronnych roślin nie tylko przy zranieniach, ale także pod działaniem wielu innych stresów abiotycznych.

## LITERATURA

- [1] ASSAF S, HADAR Y, DOSRETSZ CG. Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid, and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial pellet homogenate of *Pleurotus pulmonarius*. *J Agric Food Chem* 1995; **43**: 2173–3178.
- [2] ASAFOVA EV, ASALEEVA GA, YAKOVLEVA VG, TARCHEVSKII IA. The effect of traumatic acid on tyrosine phosphorylation of proteins in *Pea* seedlings. *Dokl Biochem Biophys* 2005; **405**: 426–428.
- [3] BATE NJ, SIVASANKAR S, MOXON C, RILEY JMC, THOMPSON JE, ROTHSTEIN SJ. Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1393–1400.
- [4] BLEÉ E, JOYARD J. Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acids hydroperoxides. *Plant Physiol* 1996; **110**: 445–454.
- [5] CHAMPAVIER Y, POMMIER MT, ARPIN N, VOILAND A, PELLON G. 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid (ODA): production, biological activities, and comparison with other hormone-like substances in *Agaricus bisporus*. *Enzyme Microb Tech* 2000; **26**: 243–251.
- [6] CROFT KPC, JÜTTNER F, SLUSARENKO AJ. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* 1993; **101**: 13–24.
- [7] DOŁĘGOWSKA B, CHLUBEK D. Nadrodzina lipoksygenaz – struktura i funkcje w metabolizmie. *Post Bioch* 2002; **48(4)**: 275–284.
- [8] ENGLISH J, BONNER J. The wound hormones of plants. Traumatol, the active principle of the bean test. *J Biol Chem* 1937; **121**: 791–799.
- [9] ENGLISH J, BONNER J, HAAGEN-SMIT AJ. Structure and synthesis of a plant wound hormone. *Science* 1939; **90**: 329.
- [10] GARDNER HW. 9-hydroxy-traumatol, a new metabolite of the lipoxygenase pathway. *Lipids* 1998; **33**: 745–749.
- [11] GOLDSMITH CR, JONAS RT, STACK TDP. C-H bond activation by a ferric methoxide complex: modeling the rate-determining step in the mechanism of lipoxygenase. *J Am Chem Soc* 2002; **124**: 83–96.
- [12] GREKCHIN AN. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* 1998; **37**: 317–352.
- [13] GREKCHIN AN, MUKHTAROVA LS, HAMBERG M. The lipoxygenase pathway in tulip (*Tulipa gesneriana*): detection of the ketol route. *Biochem J* 2000; **352**: 501–509.
- [14] GREKCHIN AN. Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. *Prostag Oth Lipid M* 2002; **68–69**: 457–470.
- [15] HOWE GA, SCHILLMILLER AL. Oxylinol metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 230–236.
- [16] LEÓN J, ROJO E, SÁNCHEZ-SERRANO JJ. Wound signaling in plants. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1–9.
- [17] MATSUI K, SHIBUTANI M, HASE T, KAJIWARA T. Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett* 1996; **394**: 21–24.
- [18] MATSUI K, SHIBATA Y, TATEBA H, HATANAKA A, KAJIWARA T. Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; **61**: 199.
- [19] MATSUI K, WILKINSON J, HIATT B, KNAUF V, KAJIWARA T. Molecular cloning and expression of *Arabidopsis* fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 477.
- [20] MATSUI K, UJITA C, FUJIMOTO S, WILKINSON J, HIATT B, KNAUF V, KAJIWARA T, FEUSSNER I. Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyase from cucumber. *FEBS Lett* 2000; **481**: 183–188.

- [21] MATSUI K, MIYAHARA C, WILKINSON J, HIATT B, KNAUF W, KAJIWARA Y. Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; **64**: 1189–1196.
- [22] MAU JL, BEELMAN RB, ZIEGLER GR. Effect of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid on growth of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* 1992; **31**: 4059–4064.
- [23] MAU JL, BEELMAN RB. Role of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. W: Royse DJ [red.] Mushroom Biology and Mushroom Products. University Park: The Pennsylvania State University 1996: 553–562.
- [24] NOORDERMEER MA, FEUSSNER I, KOLBE A, VELDINK GA, Vliegenthart JFG. Oxygenation of (3Z)-alkenals to 4-hydroxy-(2E)-alkenals in plant extracts: a nonenzymatic process. *Biochem Bioph Res Co* 2000; **277**: 112–116.
- [25] OVERBEEK J. Traumatic acid and thiamin as growth factors for algae. *Proc Nat Acad Sci* 1940; **26**: 441–443.
- [26] PIETRYCZUK A. Wpływ kwasu traumatycznego na wzrost i biochemizm *Chlorella vulgaris*. Praca magisterska. Instytut Biologii. Uniwersytet w Białymstoku 2005: ss.123.
- [27] PIETRYCZUK A, PIOTROWSKA A, CZERPAK R. Biochemical activity of traumatic acid in green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. 2006 (wysłana do druku).
- [28] ROYO J, VANCANNEYT G, PÉREZ AG, SANZ C, STÖRMANN K, ROSAHL S, SÁNCHEZ-SERRANO JJ. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J Biol Chem* 1996; **271**: 21012–21019.
- [29] SCOTT FM, BYSTROM BG, SJAHOLM V. Anatomy of traumatic acid-treated internodes of *Ricinus communis*. *Bot Gaz* 1961; **122**: 311–314.
- [30] SIEDOW JN. Plant lipoxygenase: structure and function. *Ann Rev Plant Physiol* 1991; **42**: 145–188.
- [31] SIVASANKAR S, SHELDRIK B, ROTHSTEIN SJ. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol* 2000; **122**: 1335–1342.
- [32] STELT M, NOORDERMEER MA, KISS T, ZADELHOFT G, MERGHART B, VELDINK GA, Vliegenthart FG. Formation of a new class of oxylipins from N-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 2000–2007.
- [33] STRONG FE, KRUITWAGEN E. Traumatic acid: an accelerator of abscission in cotton explants. *Nature* 1967; **215**: 1380–1381.
- [34] TRESHOW M. Physiology and anatomical development of tomato fruit tumor. *Am J Bot* 1955; **42**: 198–202.
- [35] VICK BA, ZIMMERMAN DC. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol* 1967; **57**: 780–788.
- [36] ZERINGUE HI. Effects of C-6-C-10 alkenals and alkanals on eliciting a defence response in the developing cotton boll. *Phytochemistry* 1992; **31**: 2305–2308.
- [37] ZIMMERMAN DC, COUDRON CA. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-*trans*-10-dodecenoic acid. *Plant Physiol* 1979; **63**: 536–541.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

Otrzymano: 15.03. 2006 r.-

Przyjęto: 18.07. 2006 r.

ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok,

e-mail: annapiet@uwb.edu.pl





## MARKERY APOPTOZY W PŁYTKACH KRWI

### APOPTOSIS MARKERS IN BLOOD PLATELETS

Barbara WACHOWICZ, Beata OLAS, Joanna RYWANIAK

Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki

**Streszczenie:** Płytki krwi, bezjądrzaste komórki pochodzące z megakariocytów pełnią podstawową funkcję w hemostazie i powstawaniu zakrzepów. Dowody eksperymentalne opisane w tej pracy wskazują, że podczas starzenia się płytek (przechowywania), jak i ich aktywacji dochodzi do zmian morfologicznych i biochemicznych oraz pojawienia się niektórych markerów apoptozy, takich jak w komórkach jądrzastych.

**Słowa kluczowe:** płytki krwi, markery apoptozy, aktywacja.

**Summary:** Blood platelets, enucleate cells derived from megakaryocytes, play an essential role in haemostasis and thrombosis. They may be involved probably in platelet activation and programmed death. The experimental evidences discussed in this review indicate that during aging and activation platelets express apoptotic markers similar to those found in nucleated cells.

**Key words:** blood platelets, apoptosis, activation.

**Wykaz skrótów:**  $\Delta\Psi_m$  – potencjał transbłonowy mitochondrium; **Apaf-1** (ang. *apoptosis protease activating factor-1*) – czynnik 1 aktywujący proteazy w procesie apoptozy; **Bcl-2** (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*) – produkt protoonkogenu Bcl-2; **DcR2** (ang. *decoy receptor*) – receptor pułapka; **MPs** (ang. *microparticles*) – mikropłytki; **PCs** (ang. *platelet concentrates*) – koncentraty płytkowe; **PS** (ang. *phosphatidylserine*) – fosfatydyloseryna; **PSD** (ang. *platelet storage defect*) – defekt przechowywanych płytek; **PSL** (ang. *platelet storage lesion*) – uszkodzenie przechowywanych płytek; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **RIP** (ang. *receptor interacting protein*) – białko oddziałujące z receptorem; **Smac/DIABLO** (ang. *second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*) – białko proapoptyczne Smac/DIABLO; wtórny mitochondrialny aktywator kaspazy/białko wiążące bezpośrednio IAP o niskim pI; **SRs** (ang. *scavenger receptors*) – receptory zmiatacze; **TRADD** (ang. *TNF- R1 associated death domain*) – białko adaptorowe z domeną śmierci wiążące się z receptorem TNF-R1; **TRAIL** (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – ligand z rodziny TNF indukujący apoptozę; **ZVAD-fmk** (ang. *Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone*) – inhibitor płytkowej kaspazy 3.

## WSTĘP

Płytki, najmniejsze elementy morfotyczne krwi człowieka, pełnią ważną rolę w organizmie. Zaangażowane są nie tylko w proces hemostazy, ale biorą udział w tworzeniu zakrzepów czy w powstawaniu zmian miażdżycowych w ścianach naczyń krwionośnych. Uczestniczą również w procesach zapalnych i procesie metastazy. Płytki krwi ssaków różnią się od komórek pełniących podobne funkcje w hemostazie innych kręgowców nie tylko pochodzeniem, budową morfologiczną, procesami biochemicznymi, ale również stopniem aktywacji warunkującym ich udział w hemostazie. Jedynie u ssaków, w drodze ewolucji, został ukształtowany ekonomiczny system wytwarzający z jednej komórki macierzystej – megakariocytu, od 4 do 8 tysięcy płytek. Z tego względu termin „płytką” odnosi się do pozbawionych jąder komórek krwi ssaków, a nazwę „trombocyt” rezerwuje się dla jądrzastych komórek krwi innych kręgowców, nie pochodzących z fragmentacji megakariocytów, lecz powstających z sukcesywnego podziału tromboplastów w sposób zbliżony do powstawania erytrocytów z erytroblastów. W literaturze jednak te dwa terminy dość często stosowane są wymiennie. Deckhuysen [15] po raz pierwszy w 1901 r. wprowadził nazwę „trombocyt”, uważając, że pomiędzy komórkami krwi różnych kręgowców pełniącymi funkcje hemostatyczne nie ma innych różnic aniżeli morfologiczne. W 1 mikrolitrze ludzkiej krwi znajduje się średnio 300 000 płytek krwi. Czas życia płytek krążących w krwiobiegu i nieuczestniczących w hemostazie wynosi od 9 do 12 dni. Mało poznane są natomiast szlaki śmierci płytek krwi. U ssaków płytki krwi są najmniejszymi elementami morfotycznymi krwi (średnica 2–4  $\mu\text{m}$ ), a ich cechą charakterystyczną jest brak jądra komórkowego. Płytką ssaków nie jest więc kompletną komórką, ale cechuje ją bardzo aktywny metabolizm [13]. Niepobudzona płytka ma kształt dyskoidalny. Wyróżnia ją charakterystyczne ułożenie struktur komórkowych. W centrum zlokalizowane są specyficzne ziarnistości  $\alpha$  oraz ziarnistości osmofilne o dużej gęstości elektronowej. W tych ziarnistościach są zmagazynowane liczne związki uwalniane w procesie sekrecji. Są to m.in.: białka adhezyjne (fibrynogen, trombospondyna), albumina, osoczowe czynniki krzepnięcia, czynniki wzrostu i cytokiny znajdujące się w ziarnistościach  $\alpha$ . Z ziarnistości osmofilnych uwalniane są nukleotydy adeninowe nieuczestniczące w metabolizmie (ADP, ATP), GDP, GTP, jony wapniowe, jony magnezowe, serotonina, histamina i fosfoinozytole. W płytce obecne są również lizosomy, nieliczne mitochondria (1–3), aparat Golgiego, siateczka śródplazmatyczna, peroksyosomy i ziarna glikogenu. Obwodowo pod błoną komórkową występuje sieć mikrotubul tworzących cytoszkielet płytki. W błonie komórkowej obecne są bardzo liczne receptory związane z enzymami-tycznymi drogami przekazywania sygnałów i aktywacją płytek krwi. Otoczkę zewnętrzną płytki stanowi glikokaliks.

Aby płytki krwi mogły spełniać swoje funkcje hemostatyczne, muszą ulec aktywacji. Fizjologicznymi agonistami płytek krwi są: trombina, kolagen, adrenalina, wazopresyna, czynnik aktywujący płytki (PAF), tromboksan  $A_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) czy ADP. Aktywacja płytek to proces kaskadowych, następujących gwałtownie po sobie wielu reakcji enzymatycznych, wywołanych przyłączeniem agonisty do specyficznego receptora i polegających na przekazywaniu sygnału, często przy udziale licznych heterotrimerycznych białek G do

wnętrza płytki. Odpowiedź płytki na działanie czynnika aktywującego prowadzi do adhezji, zmiany kształtu z dyskooidalnego na sferyczny, odłączania mikroplatek, powstania wypustek, sekrecji zmagazynowanych związków i tworzenia agregatów płytkowych. W wyniku tego procesu w płytce dochodzi nie tylko do gwałtownych zmian morfologicznych, ale i biochemicznych. Aktywacja płytek krwi prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , hydrolizy fosfolipidów błony, przemiany fosfatydyloinozytolu, uwolnienia arachidonianu i syntezy eikozanoidów, zmiany zawartości cyklicznych nukleotydów AMP i GMP oraz fosforylacji i defosforylacji białek przy udziale licznych kinaz i fosfataz. Autokrynną stymulacją płytek krwi przy udziale związków uwalnianych z pobudzonych płytek (ADP, serotonina) lub syntetyzowanych przez płytki krwi ( $\text{TXA}_2$ ) jest bardzo ważna w procesie powstawania agregatów płytkowych. Agregacja następuje w wyniku przekazywania sygnału („*inside-out*”) prowadząc do aktywacji i zmian konformacji receptora integrynowego  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  umożliwiając przyłączenie dimerów fibrynogenu do tych receptorów integrynowych obecnych na powierzchni różnych płytek. Przyłączenie fibrynogenu do płytki wytwarza sygnały („*outside-in*”) prowadząc do przebudowy cytoszkieletu. Aktywacji płytek towarzyszy również odszczepianie od powierzchni płytek mikrocząstek (mikroplatek) o właściwościach prokoagulacyjnych i ekspresji ujemnie naładowanych fosfolipidów (w tym fosfatydyloseryny) na powierzchni płytek krwi. Podczas aktywacji dochodzi do inicjowania dwóch, wzajemnie ze sobą powiązanych kaskad przekazywania sygnału: kaskady inicjowanej przez hydrolizę fosfolipidów błony i kaskady inicjowanej aktywacją niereceptorowych kinaz tyrozynowych [1,7,28,32,54,69]. Dokładne mechanizmy przekazywania sygnałów w płytkach krwi zostały omówione przez Olas i Wachowicz [45].

Podczas aktywacji płytek dochodzi też do powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu [16–19,24–26,31,38,39,55,65,66]. RFT w płytkach krwi powstają przede wszystkim w reakcjach enzymatycznych, takich jak: przemiana kwasu arachidonowego, cykl fosfoinozytolu, cykl glutationowy oraz w reakcjach z udziałem oksydaz błonowych, głównie oksydazy NADPH i syntazy NO. Dodatkowe wytwarzanie RFT może być indukowane przez leki, stany zapalne, jony metali ciężkich, wysiłek fizyczny oraz składniki diety. W reakcji tlenu azotu ( $\text{NO}\cdot$ ) powstającego w płytkach krwi [41,72] z anionorodnikiem ponadtlenkowym ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) uruchamiana jest gwałtowna reakcja tworzenia nadtlenoazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ) [9,37,42,43]. Dokładna rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi została opisana przez Olas i Wachowicz [46]. Przy zmniejszeniu skuteczności układów antyoksydacyjnych, nadmiar reaktywnych form tlenu i azotu wywołuje stres oksydacyjny, prowadząc do wielu negatywnych zmian w funkcjonowaniu komórek, w tym w prawidłowym funkcjonowaniu płytek krwi. Wynikiem działania stresu oksydacyjnego może być nawet wejście komórki na drogę apoptozy [4,20,22].

Proces apoptozy w płytkach jest zagadnieniem budzącym wiele kontrowersji. Po raz pierwszy problem śmierci programowanej w nieposiadających jądra płytkach krwi został zasygnalizowany w 1997 r. przez Vanags i wsp. [64]. W ostatniej dekadzie XX wieku wykazano obecność niektórych markerów apoptozy w tych komórkach. Obecny artykuł przedstawia budowę i rolę tych markerów w płytkach krwi.

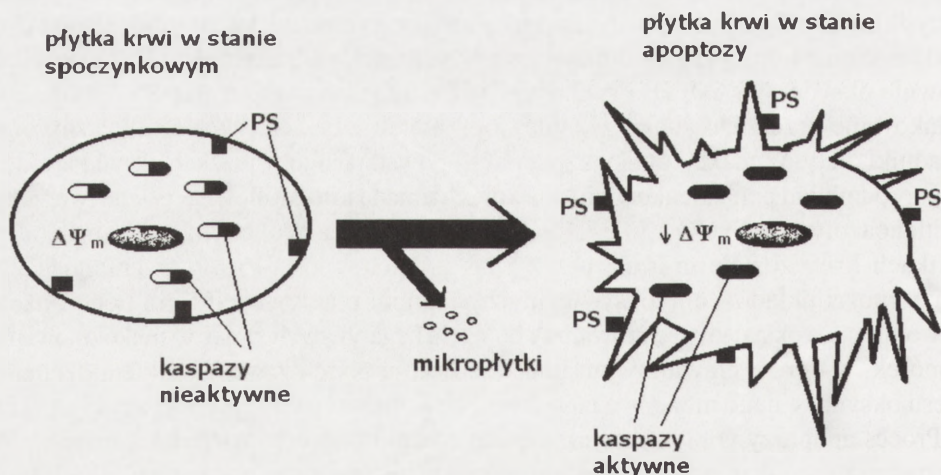
## MARKERY APOPTOZY W PŁYTKACH KRWI

Wiele markerów apoptozy występuje w płytkach krwi, ale ich dokładne funkcje są słabo poznane, m.in. ze względu na trudności stosowania metod genetycznych w komórkach pozbawionych jądra, jakimi są płytki krwi. Do tej pory, wykorzystując dostępne techniki badawcze, w płytkach krwi wykazano obecność licznych, typowych biochemicznych znaczników apoptozy, w tym markerów szlaku zewnętrznego i wewnętrznego apoptozy oraz „wykonawców” tego procesu [33]. Stwierdzono obecność „ligandów śmierci”, „receptorów śmierci”, białek adaptorowych, białek rodziny Bcl-2, kaspaz, kalpain i wykazano zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów ( $\Delta\Psi_m$ ), ekspresję fosfatydyloseryny (PS) i tworzenie mikroplatek (MPs) (ryc.1).

Na obecnym etapie badań dotyczących programowanej śmierci płytek krwi, funkcja enzymatycznych efektorowych białek apoptozy jest rozdzielona pomiędzy dwie grupy proteaz cysteinowych: kaspazy i kalpajny. Sugeruje się także możliwość przebiegu zdarzeń apoptotycznych w płytkach bez udziału aktywnych kaspaz [10,68].

### Kaspazy

Podczas analizy koncentratów płytek krwi wykryto mRNA dla licznej grupy prokaspaz, włączając prokaspazy 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 [6,12,33-35,49,59,63,67]. Nie stwierdzono obecności prokaspaz 5, 7 i 10 [33]. W modelowej płytkowej apoptozie istotną funkcję pełnią jedynie kaspazy 3 i 9, które ulegają aktywacji i indukują kaskadę apoptotycznych przemian. W przypadku apoptozy *in vitro*, wywołanej inkubacją płytek



RYCINA 1. Wybrane markery apoptozy w płytkach krwi ([33]; zmodyfikowano), objaśnienia w tekście

w temperaturze 37°C zaobserwowano, że aktywność kaspazy 3 zaczynała wzrastać po 3 godzinach, osiągając maksimum w 48 godzinie inkubacji. Towarzyszył temu rozpad głównego substratu kaspazy 3 – gelsoliny, białka zaangażowanego w remodelowanie filamentów aktynowych [6,35]. Atak kaspazy 3 na gelsolinę uwalnia dwa homologiczne fragmenty: C-końcowy (zależny od  $\text{Ca}^{2+}$ ) i N-końcowy (niezależny od  $\text{Ca}^{2+}$ , ale aktywny w apoptozie) [6]. Gelsolina ulega również rozpadowi w płytkach stymulowanych silnymi agonistami, np. A23187, trombiną z kolagenem [63]. Wzmoczona aktywność kaspazy 3 miała także miejsce po 5 dniach przechowywania płytek w warunkach standardowych, kiedy pojawiała się biologicznie czynna cząsteczka tej kaspazy – p17 [36,59], w wyniku działania na płytki silnego stresu mechanicznego (117–388 dyn/cm<sup>2</sup>) [33] oraz w obecności silnych agonistów [49,59,63]. Zaobserwowano, że wzrost aktywności kaspazy 9 następował między 6 a 9 godziną przechowywania płytek w temp. 37°C. Aktywne kaspazy (1, 3, 6, 8 i 9) zaobserwowano także *in vivo* u myszy w modelu apoptozy wywołanej infekcją malarii i indukowaną przez iniekcje TNF lub przeciwciał przeciw-płytkowych [34]. Powstawanie aktywnych form kaspaz jest kluczowym zjawiskiem w przebiegu apoptozy komórek jądrzastych prowadzącym do obkurczenia komórki, tworzenia mikroplatek, ekspozycji fosfatydyloseryny i degradacji białek cytoszkieletu.

Głównym inhibitorem płytkowej kaspazy 3 jest inhibitor ZVAD-fmk, który skutecznie hamuje jej funkcje, czego dowodem jest ograniczona proteoliza gelsoliny i zmniejszona liczba tworzących się mikroplatek [12,33,34,36,53,68]. Badania *in vitro* potwierdzają, że preinkubacja płytek ze związkiem ZVAD-fmk znacząco obniża ekspozycję fosfatydyloseryny w płytkach stymulowanych jonoforem wapniowym A23187 i fizjologicznym płytkowym agonistą ADP. Inhibitor ZVAD-fmk obniża również agregację płytek wywołaną ADP, co może wskazywać na udział kaspaz nie tylko w apoptozie, ale także w aktywacji płytek [12]. ZVAD-fmk hamuje również wytwarzanie mikroplatek i udostępnienie prokoagulacyjnych miejsc na powierzchni płytek sprzyjając zakrzepicy. Podobne działanie ma inhibitor DEVD-fmk [34,59]. Wzrost liczby mikroplatek w krwiobieg jest obserwowany przy licznych zaburzeniach hemostazy (aktywacja krzepnięcia, niedokrwienie miejscowe, stany pooperacyjne, dysfunkcja mięśnia sercowego) [1,73]. Ekspozycja fosfatydyloseryny na powierzchni płytki oraz uwalnianie mikroplatek są zjawiskami towarzyszącymi prawidłowemu procesowi hemostazy i tworzeniu zakrzepów, poprzez dostarczanie powierzchni do przyłączenia czynników prokoagulacyjnych. Wydaje się, że inhibicja płytkowych kaspaz może być czynnikiem zapobiegającym powstawaniu zakrzepów i w związku z tym może mieć w przyszłości kluczowe znaczenie w terapii przeciwzakrzepowej [59].

Uważa się również, że apoptoza w płytkach krwi może zachodzić niezależnie od kaspaz [10,68]. Wolf i wsp. [68] nie stwierdzili aktywności kaspazy 3 po aktywacji płytek trombiną, trombiną i kolagenem oraz jonoforem wapniowym (A23187 lub jonomycyny). Aktywacja kaspazy 3 nie zachodziła także podczas starzenia się płytek *in vitro* w hodowli niezawierającej osocza przy występowaniu typowych morfologicznych i biochemicznych cech apoptozy [10]. W płytkach pozbawionych osocza (prawdopodobnie ważnego źródła czynników przeżycia) zaobserwowano również przyspieszoną apoptozę płytek *in vitro* w temp. 37°C [10]. Dodanie inhibitora kaspazy

3 (ZVAD-fmk) nie wywoływało żadnych zmian w płytkach, dlatego zasugerowano, że kaspazy nie są włączone w programowaną śmierć płytek [10]. Amor i wsp. [2] zaobserwowali po aktywacji płytek trombiną zwiększoną aktywność kaspaz 3 i 9 we frakcji cytoszkieletu bez zmian aktywności we frakcji cytosolowej. Zastosowanie inhibitora polimeryzacji aktyny obniżało aktywację obu kaspaz, co może świadczyć o związku tych enzymów z cytoszkieletem aktynowym. Stymulacja płytek krwi trombiną indukuje nie tylko przemieszczenie do cytoszkieletu form kaspaz aktywnych, ale również prokaspaz 3 i 9.

Fagocytoza płytek w kaspazo-niezależnej apoptozie odbywa się za pośrednictwem tzw. receptorów zmiataczy (SRs, ang. *scavenger receptors*) [10]. Receptory zmiatacze wiążą się z acetylowanymi lub utlenionymi lipoproteinami (ac- lub oxLDL) powstającymi w trakcie apoptozy, a także z innymi białkami o charakterze polianionów na powierzchni komórek apoptotycznych. Wyróżnia się dwie główne klasy tych białek receptorowych: SR-A i SR-B. Receptory klasy A (SR-AI i SR-AII) występują przede wszystkim na makrofagach i charakteryzują się domeną kolagenową zawierającą miejsca wiązania acetylowanych lipoprotein (acLDL). Głównymi przedstawicielami klasy B są SR-BI oraz CD36. W przeciwieństwie do SR-A, receptory zmiatacze klasy B mogą wiązać fosfatydyloserynę [60].

Rola kaspaz w płytkach krwi ciągle budzi wiele wątpliwości. Kaspazy nie uczestniczą w aktywacji płytek krwi [68]. Biorąc pod uwagę fakt, że apoptoza może przebiegać również bez udziału kaspaz, nie wyjaśniono jeszcze znaczenia kaspaz w biologii płytek krwi [10,68]. Eksperymenty *in vitro* wskazują, że wytwarzanie płytek jest skorelowane czasowo z początkiem apoptozy megakariocytów, w której uczestniczą kaspazy [8,11,-62,68]. Tak więc można przypuszczać, iż kaspazy pełnią potencjalną rolę w powstawaniu płytek krwi, a płytkowe kaspazy pochodzą z megakariocytów [68].

### Kalpains

W płytkach krwi kalpains należące do grupy proteaz cysteinowych zależnych od  $Ca^{2+}$  występują w formie nieaktywnej i stanowią ok. 2% białek płytkowych [34]. Aktywację kalpain stwierdzono podczas stymulowania płytek jonoforem wapniowym (jonomycyny lub A23187), trombiną oraz/lub kolagenem [34,64,68]. Kalpains biorą udział w powstawaniu mikroplatek, ekspozycji PS, zmianie kształtu komórki, degradacji gelsoliny i białkowej kinazy C [34,64,68]. Kalpains odpowiadają za rozpad białek cytoszkieletu – filaminy, taliny i miozyny, prowadząc do zmian morfologicznych płytek oraz zaburzenia drogi przekazywania sygnału w komórce [67].

Badania *in vitro* po zastosowaniu inhibitora kalpain – kalpeptyny dowiodły, że kalpains (obok kaspaz) są również enzymami wykonawczymi apoptozy [34]. Kalpeptyna hamuje rozwój zdarzeń apoptotycznych w apoptozie płytek indukowanej jonoforem wapniowym, zapobiega degradacji białek cytoszkieletu, obkurczaniu komórki, tworzeniu mikroplatek oraz aktywacji kaspaz 3 i 9 [64,68]. W płytkach stymulowanych dwoma silnymi agonistami (trombiną i kolagenem), kalpeptyna ogranicza tworzenie mikroplatek i rozpad miozyny, ale powoduje wzrost ekspozycji fosfatydyloseryny [34]. Ponieważ aktywne kalpains dotychczas zidentyfikowano tylko w modelu apoptozy wywołanej agonistami

(fizjologicznymi: trombina, kolagen i niefizjologicznymi: jonofor wapniowy A23187), można przypuszczać, że kalpains są bardziej związane z aktywacją płytek niż z ich apoptozą, chociaż wywołane przez nie modyfikacje odzwierciedlają typowe zdarzenia apoptotyczne [59].

### „Receptory śmierci”, „ligandy śmierci” i białka adaptorowe

Analiza markerów apoptotycznych na poziomie mRNA i białek wykazała, że płytki mają mRNA dla liganda śmierci TRAIL, receptorów śmierci TNF-R1, DcR2, DR3, DR4 i DR5 oraz dla białek adaptorowych TRADD i RIP (tab.1) [34,53]. Badania *in vitro* potwierdziły ekspresję ligandu TRAIL (czynnik proapoptotyczny z rodziny TNF) w pobudzonych płytkach oraz w czasie różnicowania megakariocytów [14]. Ekspresję błonowego receptora DcR2 (ang. *decoy receptor* – receptor pułapka) rejestrowano w początkowej fazie przechowywania koncentratów płytkowych [53]. Zaobserwowano także, że spadek potencjału transbłonowego mitochondriów płytki ma miejsce w apoptozie indukowanej agonistami [63] i silnym stresem mechanicznym [33] oraz podczas starzenia się płytek *in vivo* u psów [48]. Spadek  $\Delta\Psi_m$  wykryto również między 13 a 14 dniem w przechowywanych koncentratkach płytkowych [33,48,67].

TABELA 1. Receptory śmierci, ligandy śmierci i białka adaptorowe obecne w komórkach jądrzastych i płytkach krwi ([34], zmodyfikowano)

Receptory i ligandy śmierci	Komórki jądrzaste	Płytki krwi
<b>Receptory śmierci:</b>		
TNFR1 (p55)	+	+
Fas (Apo1)	+	–
DR3 (Apo3)	+	+
DR4 (TRAIL-R1)	+	+
DR5 (Apo2, TRAIL-2)	+	+
DcR1	+	–
DcR2	+	+
<b>Ligandy śmierci:</b>		
TNF	+	
FasL	+	
Apo3L	+	
TRAIL (Apo2L)	+	+
<b>Białka adaptorowe:</b>		
FADD	+	
TRADD	+	+
RIP	+	+

### Białka rodziny Bcl-2

Kuter i wsp. [29] oraz Leytin i Freedman [34] wykazali w płytkach krwi zarówno ekspresję mRNA dla wielu białek rodziny Bcl-2, jak i ich obecność na poziomie białka (tab. 2). W płytkach krwi odnaleziono szereg białek z rodziny Bcl-2, w tym aktywatory (Bak, Bax, Bad) i inhibitory (Bcl-X<sub>L</sub>, Bfl-1, Mcl-1) apoptozy. Nie stwierdzono natomiast obecności proapoptotycznego białka Bik i antyapoptotycznego białka Bcl-W [33,36]. W hodowli starzejących się płytek w temp. 37°C [6] oraz poddanych działaniu wapniowego jonoforu jonomyocyny [64] następował wzrost ekspresji białek Bak i Bax [10] oraz obniżenie poziomu białka Bcl-X<sub>L</sub> (37°C), co prowadziło do wzrostu wrażliwości płytek na bodźce apoptotyczne [6]. W płytkach stymulowanych różnymi czynnikami, przyczyniającymi się do indukcji apoptozy, pojawiają się zmiany w poziomie ekspresji

TABELA 2. Białka rodziny Bcl-2 w płytkach krwi (zmiany poziomu ekspresji w zależności od warunków) ([34, 48], zmodyfikowano)

Rodzina białek Bcl-2	Płytki niestymulowane	Płytki stymulowane			
		Jonofor wapniowy	Agoniści fizjologiczni	Przechowywane w temp. 37°C	Przechowywane w temp. 22°C
Proapoptotyczne					
Bak	+ r, b	^ b		^ b	
Bax	+ r, b	^ b		^ b	= b
Bad	+ r				
Bik	- r				
Bid	+ b				= b
Bim	+ b				
Antyapoptotyczne					
Bcl-2	+/- r, b	= b		= b	^ b
Bcl-X <sub>L</sub>	+ r				^ b
Bcl-w	- r				
Bfl-1	+ r			= b	
Mcl-1	+ r				

+ obecne, - nieobecne, = bez zmian, +/- obecność? r - test na obecność mRNA, b - test na obecność białka

niektórych białek proapoptotycznych [29,34,36]. Zmiany poziomu ekspresji białek rodziny Bcl-2 przedstawiono w tabeli 2.

Wśród płytkowych białek antyapoptotycznych duże znaczenie ma białko Bcl-X<sub>L</sub>, które powstrzymuje proapoptotyczny wpływ Bid i zapobiega uwalnianiu cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy (w płytkach przechowywanych w temp. 37°C). Obniżenie poziomu białka Bcl-X<sub>L</sub> nasila wrażliwość płytek na bodźce apoptotyczne [6]. Białko Bcl-X<sub>L</sub> ma także wpływ na przeżycie macierzystych komórek płytek krwi. Wysoki poziom ekspresji Bcl-X<sub>L</sub>, obserwowany *in vitro* w populacji wczesnych komórek megakariocytów (prekursory CD34(+)) traktowane estrem forbolu), ulega obniżeniu w miarę starzenia się megakariocytów [56]. Opisywanemu zjawisku towarzyszy wzrost liczby komórek ulegających apoptozie oraz pojawienie się cytoplazmatycznych struktur przypominających przedpłytki. Dlatego przypuszcza się, że białko Bcl-X<sub>L</sub> odgrywa rolę w powstawaniu płytek krwi poprzez regulację żywotności i różnicowania megakariocytów [56]. Spośród zidentyfikowanych dotychczas w płytkach krwi pięciu białek proapoptotycznych (Bak, Bax, Bad, Bid i Bim), w stymulowanych płytkach dochodzi do zwiększonej ekspresji tylko dwóch białek – Bak i Bax. Białka Bax i Bak przyczyniają się do wypływu cytochromu c z mitochondriów, na skutek ich przyłączenia do napięciowo-zależnych kanałów anionowych (VDAC) w błonie mitochondrialnej [6,10,64,67].



## Ekspozycja fosfatydyloseryny

Błona płytek krwi charakteryzuje się asymetrią fosfolipidów [57]. Fosfatydylocholina i sfingomielinina są obecne na powierzchni błony płytkowej, natomiast kwaśne fosfolipidy, m.in. fosfatydyloseryna (PS) są zlokalizowane w części wewnętrznej błony. Podczas aktywacji płytek krwi trombiną czy kolagenem następuje bardzo szybka redystrybucja niektórych fosfolipidów, zwłaszcza przemieszczenie PS, która pojawiając się w monowarstwie zewnętrznej błony, nadaje jej własności prokoagulacyjne i zapewnia prawidłowy przebieg hemostazy. W wielu komórkach obserwowano ekspozycję PS podczas apoptozy, chociaż przemieszczenie fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej nie jest niezbędne dla fenotypu apoptozy. Ekspozycję fosfatydyloseryny na powierzchni komórki zaobserwowano w apoptozie płytek indukowanej wapniowym jonoforem, trombiną, kolagenem, ADP oraz w czasie przechowywania koncentratów płytkowych, jak i zawiesiny starzejących się płytek (także *in vivo*) [33,34,36,40,48,49,-63,64,67,68]. Zaburzenie asymetrii błonowych fosfolipidów i tym samym ekspozycję fosfatydyloseryny powodować mogą w płytkach miejscowe środki znieczulające, które wpływają na depolaryzację błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c oraz na przemianę prokaspaz 3 i 9 do aktywnych form [3]. Obecność fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni dwuwarstwy lipidowej błony płytek krwi jest uznawana za wskaźnik zarówno płytkowej apoptozy, jak i aktywacji.

W komórkach jądrazstych ekspozycja PS jest znacznikiem apoptozy zależnej od kaspaz. Fosfatydyloseryna na powierzchni płytek w stanie apoptozy przyczynia się do usuwania płytek z krążenia za pośrednictwem makrofagów wyposażonych w receptory dla fosfatydyloseryny PS-R [60]. W przemieszczenie fosfatydyloseryny do warstwy zewnętrznej błony zaangażowana jest skramblaza, czyli translokaza fosfatydyloseryny, ATP-aza zależna od  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , aktywowana przez białkową kinazę C (PKC) [60]. Aktywacja skramblazy jest niezbędna do zmiany asymetrii błonowych lipidów podczas apoptozy. Zwiększoną ekspozycję PS na zewnętrznej stronie błony płytek krwi mogą wywoływać zaburzenia metaboliczne powodujące spadek poziomu ATP, aktywacja płytek oraz oksydacyjne uszkodzenia transporterów lipidów błonowych [3,30]. Fosfatydyloseryna na powierzchni błony płytek wykazuje efekt prokoagulacyjny, przyspieszając enzymatyczną degradację białek krzepnięcia [73]. Obecność PS na powierzchni płytek (oraz uwalnianie mikroplatek) wpływa na przyłączanie fibrynogenu do płytek (tworzenie agregatów płytkowych) oraz sprzyja powstawaniu zakrzepów poprzez dostarczanie powierzchni dla czynników koagulacyjnych [49]. Aneksyna należąca do białek antykoagulacyjnych, nieglikozylowanych, wiążących wapń i fosfolipidy może przyłączać się do PS płytek hamując aktywację czynników krzepnięcia [33,49,61,67]. Powierzchniowa PS może być także wskaźnikiem jakości koncentratów płytkowych przeznaczonych do transfuzji. Wzrost ilości PS na powierzchni błony płytek może oznaczać uszkodzenie przechowywanych płytek i wskazywać, które płytki muszą zostać usunięte z krążenia przy udziale fagocytów zawierających receptory dla PS (np. receptor SR-B1 i CD36) [30].

## Powstawanie mikroplatek

Mikroplateki pojawiają się w wyniku stymulowania platek (*in vitro*) jonoforem wapniowym, trombiną, kolagenem, ADP oraz podczas przechowywania platek (w temp. 22 i 37°C) [34]. Mikroplateki powstają także *in vivo* u myszy w modelu apoptozy wywołanym infekcją malarii i indukowanym przez iniekcje TNF lub przeciwciał antyplatekowych [34]. Formowanie mikroplatek wymaga degradacji cytoszkieletu płytki oraz aktywacji kalpain [33,34,49,67]. Podawanie myszom inhibitora kaspazy (ZVAD) powodowało spadek liczby uwalnianych mikroplatek, dlatego też sugeruje się, że kluczową rolę w fragmentacji platek krwi mogą odgrywać kaspazy [34,59].

## Potencjał transbłonowy mitochondriów i cytochrom c

W umierających wskutek apoptozy płytkach krwi otwieranie megakanałów mitochondrialnych przyczynia się m.in. do zmian potencjału transbłonowego ( $\Delta\Psi_m$ ) i uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów białek apoptogennych. Białka uwalniane z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów platek to m.in. zymogeny enzymów efektorowych apoptozy – kaspazy 9 (Apaf-3) czy ich aktywatory (cytochrom c (Apaf-2), Smac/DIABLO) [33,67]. Stosując technikę *immunoblotting* potwierdzono obecność proapoptotycznego, mitochondrialnego białka Smac/DIABLO, które było uwalniane do cytozolu platek w 11 dniu przechowywania koncentratów platekowych w standardowych warunkach (temp. 22°C) [53].

## APOPTOZA MEGAKARIOCYTÓW A POCZĄTEK BIOGENEZY PŁYTEK KRWI

Płytki krwi człowieka powstają z megakariocytów. Z jednego megakariocytu powstaje 6 tzw. przedplatek, a z każdej przedplateki powstaje z kolei około 1200 platek. Czas życia pojedynczej płytki – jeśli nie zostanie zaktywowana – wynosi zaledwie 9–12 dni. Tak krótki czas życia powoduje, iż duża część tych komórek usuwana jest z krążenia bez spełnienia swojej funkcji hemostatycznej i śmierć płytki następuje w wyniku fagocytozy przez makrofagi [11,13].

Jak to się jednak dzieje, że makrofagi „wiedzą”, które płytki należy sfagocytować? Co jest sygnałem dla makrofagów, że po tak krótkim okresie życia płytka musi zostać unicestwiona? Pytania dotyczące śmierci tych bezjądrzastych komórek pozostawały przez wiele lat bez odpowiedzi. Przypuszczano, że usunięcie kwasu sialowego z glikoprotein powierzchniowych błony (odsłonięcie galaktozy) może być sygnałem do wychwytywania platek krwi z krwiobiegu [70].

W płytkach krwi, tak jak w komórkach jądrzastych, obserwuje się aktywację enzymów efektorowych potrzebnych w przebiegu apoptozy, a także stwierdza obecność takich samych, choć nie wszystkich, markerów apoptozy dla komórek jądrzastych. Obecność białek pro- i antyapoptotycznych, a także ekspozycja na powierzchni platek

fosfatydyloseryny czy obserwowany spadek potencjału wewnątrzblonowego mitochondrium [34,59,64,71] wraz z towarzyszącymi zmianami morfologicznymi, takimi jak: obkurczanie krwinek, kondensację ich cytoplazmy, tworzenie pęcherzyków błony komórkowej i wytwarzanie filopodiów, sugeruje możliwość zjawiska apoptozy w płytkach. Do niedawna wszystkie te zmiany opisywano jako aktywację płytek, ale od 1997 roku zaczęto uważać ten proces za apoptozę [9,64]. Jako pierwsi obecność apoptozy w płytkach zasugerowali Vanags i wsp. w 1997 roku [64]. Obecnie wielu badaczy potwierdza występowanie zdarzeń podobnych do apoptozy (ang. *apoptosis-like events*) w płytkach krwi [48,68]. Badanie apoptozy w płytkach jest jednak bardzo trudnym wyzwaniem, gdyż płytki krwi są bardzo wrażliwe na działanie różnych bodźców. Pod wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych płytki bardzo szybko ulegają aktywacji, i zarówno podczas aktywacji, jak i podczas apoptozy dochodzi do podobnych zmian w płytkach [29,34,36,64].

Płytki mogą zawierać w swoim mitochondrialnym genomie informację genetyczną o programowanej śmierci pochodzącą i przekazaną od swoich komórek macierzystych – jądrzastych megakariocytów [58,67].

Istnieje ścisły związek pomiędzy apoptozą megakariocytów a powstawaniem płytek krwi. Apoptoza megakariocyta („koniec”) prowadzi do powstawania płytek, tak więc jest właściwie „początkiem” [8,27,62]. Pod wpływem hematopoetycznych czynników wzrostu, zwłaszcza trombobopoetyny, komórki pnia szpiku kostnego przechodzą procesy proliferacji, różnicowania, dojrzewania, stając się dojrzałymi megakariocytami. Zakończenie życia dojrzałego megakariocyta w drodze apoptozy jest zasocjowane w czasie z formowaniem się nowych płytek. Śmierć wczesnych stadiów macierzystych komórek płytek krwi obserwuje się jedynie w stanach patologicznych, np. w czasie terapii nowotworowej lub infekcji wirusem HIV [35].

W początkowym etapie biogenezy płytek z megakariocytów powstają ich prekursorowe odpowiedniki – przedpłytki. Tworzenie tych struktur jest połączone z radykalnymi zmianami w cytoszkielecie megakariocyta, obejmującymi aktywację mikrotubul, polimeryzację aktyny oraz fosforylację miozyny [8,62]. Według teorii tworzenia przedpłytek opisaną przez Italiano i wsp. [23], prekursorzy płytek wyłaniają się w postaci długich, rurkowatych, bulwiasto zakończonych cytoplazmatycznych uwypukleń, w końcu zróżnicowanych megakariocytach. Bulwiaste, nabrzmięte zakończenia zawierają peryferyczne pęczki mikrotubul, które skręcają się przybierając formy kłębkowate i łezkowate. Powstałe przedpłytki są dynamicznymi strukturami, a dzięki aktywnym mikrotubulom mogą odwracalnie zmieniać kształt na tubularny czy rozszerzony, a następnie ulegając fragmentacji uwalniać płytki krwi do krążenia [5,23]. Przekształcenie dynamicznej, labilnej struktury przedpłytek, niezbędnej do tworzenia licznych odgałęzień, w sztywne rusztowanie następuje tuż przed uwolnieniem płytek dzięki zespoleniu błony z cytoszkieletem aktynowym. Formowanie gotowych płytek krwi odbywa się w końcowej fazie różnicowania przedpłytek [23].

Niezbędnym warunkiem dla wytwarzania płytek z megakariocytów jest aktywacja kaspaz [8,11,62]. Badania *in vitro* wykazały obecność aktywnych kaspaz 3 i 9 w końcowym stadium dojrzewania megakariocytów [8,62]. Spontaniczna aktywacja

kaspaz, obserwowana w warunkach fizjologicznych, jest niezbędna dla powstania płytek, gdyż wykazano, że inhibitory kaspaz znacznie obniżają tworzenie przedpłytek, a megakariocyty wyrażające silną ekspresję antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (hamujących aktywność kaspaz) mają znacznie zredukowaną zdolność formowania przedpłytek [8,62]. Aktywacja kaspazy 3 powoduje zmiany w podstawowych białkach cytoszkieletu włączonych w proces tworzenia przedpłytek, tj. w miozynie (fosforylacja) i aktynie (polimeryzacja) [62]. Aktywna kaspaza 3 modyfikuje przepuszczalność błony mitochondrialnej. W wyniku otwierania megakanałów dochodzi do uwolnienia z mitochondrium proapoptotycznego cytochromu c, co może sugerować aktywację wewnętrznego, mitochondrialnego szlaku apoptozy [8]. Substratami kaspazy 3 są również inne molekuly, np. gelsolina, Rho-kinaza (powodująca tworzenie pęcherzyków błony komórkowej) i PARP – polimeraza poli (ADP-rybozy) [8]. Wykazano również (*in vitro*), że inhibitor kaspaz ZVAD-fmk (główny inhibitor kaspazy 3) skutecznie blokuje tworzenie przedpłytek [11].

W indukcji apoptozy megakariocytów bezpośrednio związanej z tworzeniem płytek może odgrywać rolę tlenek azotu. Badania *in vitro* potwierdziły również udział tlenu azotu w rozwoju megakariocytów i trombopoecie. Doświadczenia przeprowadzone na szczurach wykazały, że zwierzęta, którym podano L-nitroargininę – inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*), miały obniżoną o 50% liczbę płytek w krążeniu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi [5]. Megakariocyty, wytwarzając płytke niemal równocześnie ulegają apoptozie, która w tym przypadku może odpowiadać za usuwanie starych, „zużytych” megakariocytów [5].

Pedreño i wsp. [47] przedstawili zupełnie nowy, odmienny mechanizm wytwarzania płytek krwi umożliwiający powstawanie płytek bezpośrednio we krwi, a nie, jak dotąd uważano, wyłącznie w szpiku kostnym. Proces ten polega na „wyrzucaniu” ostatecznie dojrzałych płytek wprost do krwi przez megakariocyty znajdujące się w krążeniu, natomiast czynnikiem indukującym jest przypuszczalnie trombina [47].

## MODELE APOPTOZY W PŁYTKACH KRWI W WARUNKACH *IN VITRO* I *IN VIVO*

Apoptoza i aktywacja płytek to procesy bardzo podobne pod względem zmian morfologicznych czy biochemicznych. Apoptozę płytek porównywano także z procesem uszkodzenia płytek podczas ich przechowywania [58]. Do tej pory opisano 5 zjawisk modelowych, demonstrujących apoptozę w płytkach, w tym 3 modele przedstawiające apoptozę *in vitro* i 2 *in vivo*.

W płytkach w warunkach *in vitro* obserwowano:

- apoptozę indukowaną нефizjologicznymi agonistami – wapniowym jonoforem jonomycyny [64] i A23187 [36,59,68], jak i fizjologicznymi agonistami płytek: trombiną, kolagenem, mieszaniną trombiny i kolagenu, analogiem tromboksanu A<sub>2</sub> – U46619 [59,68];

- apoptozę, do której dochodzi w procesie starzenia płytek podczas przechowywania przemytych płytek (płytek inkubowanych przez 18–24 godzin w temp. 37°C) [10];
- apoptozę indukowaną starzeniem się koncentratów płytkowych o niskiej zawartości leukocytów (PCs, ang. *leukodepleted platelet concentrates*) w warunkach standardowego przechowywania płytek w temp. 22°C [36,49,53] i 37°C [29].

W płytkach, w warunkach *in vivo* obserwowano: apoptozę powiązaną ze starzeniem płytek u psów z trombopoezą tłumioną estradiolem (podawanym w iniekcjach) [48] oraz apoptozę w płytkach myszy z trombocytopenią wywołaną infekcją malarii [50] i indukowaną przez iniekcje czynnika martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) [51] lub przeciwciał przeciwplateletowych [52].

## MARKERY APOPTOZY PŁYTEK KRWI PODCZAS ICH PRZECHOWYWANIA

Wyizolowane z krwi płytki podczas przechowywania ulegają licznym zmianom, które powodują upośledzenie ich prawidłowej struktury i funkcji. Te morfologiczne-metaboliczne zaburzenia ograniczają możliwość przechowywania płytek i mogą być przyczyną osłabionej rekonwalescencji pacjenta po transfuzji masy płytkowej [49]. Pojawiające się modyfikacje płytek są określane jako: 1) defekt przechowywanych płytek PSD (ang. *platelet storage defect*) [49]; 2) uszkodzenie przechowywanych płytek PSL (ang. *platelet storage lesion*) [58]. Zaobserwowano również, że wraz z wydłużeniem okresu przechowywania płytek w warunkach *in vitro* maleje ich przeżywalność i dochodzi do nasilenia zmian morfologicznych i biochemicznych (zarówno w podwyższonej temperaturze (37°C), jak i w standardowych warunkach przechowywania krwi w temperaturze 20–24°C) [6,34,36,49,58,67]. Zaburzenia opisywane jako uszkodzenia typu PSL pojawiają się w odpowiedzi na stres mechaniczny, hipoksję oraz obniżoną lub podwyższoną temperaturę. Uszkodzenia typu PSL prowadzą do tworzenia mikroplateletów, reorganizacji cytoskieletu i ekspozycji PS. Wymienione zmiany morfologiczne i biochemiczne towarzyszące temu uszkodzeniu płytek odpowiadają właściwościom apoptotycznej śmierci, ale również aktywacji płytek krwi, w związku z czym pojawia się wątpliwość czy uszkodzenia typu PSL są równe apoptozie [58].

Chociaż prawidłowy czas życia płytek w krążeniu oceniono na około 10 dni, w warunkach pozaustrojowych już po pięciu dniach w temp. 22°C pojawiają się oznaki apoptozy, takie jak: ekspozycja PS, podwyższenie poziomu ekspresji mRNA dla prokaspaz, receptorów śmierci i białek Bcl-2, wytworzenie aktywnej cząsteczki kaspazy 3 (p17) i rozpad gelsoliny [34,36,49]. Przechowywane płytki są również bardziej wrażliwe na bodźce apoptotyczne, w tym na działanie agonistów (jonofor wapniowy, trombina, kolagen) [49]. Przeżywalność płytek krwi wyraźnie maleje podczas ich przechowywania w temp. 37°C, przy dodatkowym zwiększonym ryzyku zanieczyszczenia bakteriami. Dla płytek krwi temperatura 37°C została uznana za temperaturę stresową, indukującą apoptozę. O ile temperatura 22°C redukuje żywotność płytek dopiero po pięciu dniach,

w temperaturze 37°C zanik prawidłowych funkcjonalnych cech płytek w warunkach *in vitro* obserwowano już po 24 godzinach. Po trzech godzinach dochodzi do wzrostu aktywności kaspazy 3 (osiągającej maksimum po 48 godzinach), a między 6 a 9 godziną do pojawienia się aktywnej formy kaspazy 9 [6]. Innymi przejawami uruchomienia apoptotycznej maszynerii w płytkach przechowywanych (w temp. 37°C) jest rozpad gelsoliny, obniżenie poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-X<sub>L</sub>, ekspozycja na powierzchni PS i uwolnienie cytochromu c [6,34,67]. Sugeruje się także, że indukcja apoptozy płytek krwi w temp. 37°C może być spowodowana niedoborem metabolicznie ważnych substratów, sekrecją lub akumulacją czynników proapoptotycznych [6]. Płytki inkubowane przez trzy godziny *in vitro* w temp. 37°C zużywają tlen dwukrotnie szybciej niż w temperaturze 22°C [21]. Zwiększenie tempa przemian metabolicznych i zużywania substratów metabolicznych przyczyniać się może do skrócenia czasu życia płytek. Ciągłe jednak pozostaje zagadką, dlaczego w warunkach *in vivo* płytki krwi w temp. 37°C żyją 8–10 dni, podczas gdy w warunkach *ex vivo* tracą żywotność po dwóch dniach [6].

## UWAGI KOŃCOWE

Istnieje hipoteza, że apoptoza i aktywacja płytek to prawdopodobnie ten sam proces [63,68]. Hipoteza ta uwzględnia wspólne cechy morfologiczne i biochemiczne apoptozy i aktywacji, takie jak: zmiana kształtu płytki, modyfikacja cytoszkieletu, fuzja ziarnistości z błoną plazmatyczną, tworzenie pęcherzyków błony, uwolnienie mikroplatek, ekspozycja na powierzchni fosfatydyloseryny [6,33,34,49,67,68]. Wydaje się jednak, że nie ma znaku równości między apoptozą a aktywacją płytek krwi (tab. 3). Większość danych eksperymentalnych wskazuje na odmiennosc tych dwóch procesów. Przemawiają za tym przede wszystkim typowe zjawiska apoptotyczne, których nie obserwuje się w czasie aktywacji płytek, a do których zalicza się spadek potencjału wewnątrz-błonowego mitochondriów  $\Delta\Psi_m$ , uwolnienie cytochromu c, wzrost ekspresji proapoptotycznych białek Bcl-2 oraz obecność aktywnej kaspazy 3 i 9 [6,10,33,34,36,48,49,59,63,67,68]. W procesie apoptozy płytek nie zaobserwowano ani adhezji płytek do komórek śródbłonna, ani zwiększonego metabolizmu inozytoli czy fosforylacji wtórnych przekaźników białkowych [68]. Dodatkowym elementem różniącym wspomniane procesy jest szybkość ich przebiegu i pojawiania się charakterystycznych cech, tzn. w aktywacji płytek zmiany pojawiają się gwałtownie i niemal natychmiast, podczas gdy odpowiedź płytek na bodziec apoptotyczny przebiega wolniej [49,68]. Wiele wątpliwości i sprzeczności wzbudza udział kaspaz i kalpain w tych procesach. Kaspazy są powszechnie uznawane za głównych wykonawców apoptozy, nie tylko w komórkach jądrzastych, ale również w płytkach krwi [12,33,34,36,44]. Znacznie mniejszą rolę przypisuje się kalpainom, jak dotąd aktywnym jedynie w modelu apoptozy płytek indukowanej silnymi agonistami [34,68]. Chociaż kalpains zostały uznane za znaczniki płytkowej apoptozy [34], ich funkcja jest znacznie lepiej udowodniona w procesie aktywacji, w którym nie

TABELA 3. Zmiany morfologiczne i biochemiczne towarzyszące aktywacji i apoptozie płytek krwi

Aktywacja płytek krwi	Apoptoza płytek krwi
Tworzenie mikropłytek Ekspozycja osfatydyloseryny Reorganizacja białek cytoszkieletu (udział kalpain)	tworzenie mikropłytek ekspozycja fosfatydyloseryny reorganizacja białek cytoszkieletu (udział kaspazy 3 i 9, kalpain) obecność ligandów śmierci obecność receptorów śmierci obecność białek adaptorowych obecność rodziny białek Bcl-2 zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów

biorą udziału aktywne kaspazy. Wolf i wsp. [68] przedstawili trzy dowody potwierdzające udział kalpain a nie kaspaz w aktywacji płytek: 1) apoptoza, a nie aktywacja jest skorelowana z procesem aktywacji kaspaz; 2) zdarzeniom apoptozopodobnym podczas stymulowania płytek A23187 zapobiega inhibicja kalpain a nie kaspaz; 3) w czasie aktywacji płytek nie dochodzi do uwolnienia z mitochondriów cytochromu c jako kluczowego elementu aktywacji kaspaz (szlak mitochondrialny).

Na obecnym poziomie wiedzy można przypuszczać, że przebieg procesu apoptozy w płytkach krwi na szlaku zewnętrznym czy wewnętrznym w znacznym stopniu zależy od rodzaju czy siły induktora apoptozy. Zastosowanie w badaniach megakariocytów (jądrzastych prekursorów płytek krwi) czy megakariocytycznych linii komórkowych powinno zwiększyć postęp wiedzy o szlakach procesu apoptozy i ich regulacji w płytkach krwi.

## LITERATURA

- [1] ABRAMS CS, BRASS LF. Platelet signal transduction. W: RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes, JN George [red.] Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. Lippincott Williams and Wilhins. Philadelphia, USA, Chapter 31, 2001: 541–559.
- [2] AMOR NB, PARIENTE JA, SALIDO GM, BARTEGI A, ROSADO JA. Caspases 3 and 9 are translocated to the cytoskeleton and activated by thrombin in human platelets. Evidence for the involvement of PKC and the actin filament polymerization. *Cell Signal* 2006; **18**: 1252–1261.
- [3] AUGEREAU O, ROSSIGNOL R, DEGIORGI F, MAZAT JP, LETELLIER T, DACHARY-PRIGENT J. Apoptotic-like mitochondrial events associated to phosphatidylserine exposure in blood platelets induced by local anaesthetics. *Thromb Haemost* 2004; **92**: 104–113.
- [4] BARTOSZ G. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Bioch* 1998; **44**: 22–31.
- [5] BATTINELLI E, WILLOUGHBY SR, FOXALL T, VALERI, CR, LOSCALZO J. Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. *Cell Biol* 2001; **98**: 14458–14463.
- [6] BERTINO AM, QI XQ, LI J, XIA Y, KUTER DJ. Apoptotic markers are increases in platelets stored at 37°C. *Transfusion* 2003; **43**: 857–866.
- [7] BLOCKMANS D, DECKMYN H, VERMYLEN J. Platelet activation. *Blood Rev* 1995; **9**: 143–156.
- [8] BOTTON S, SABRI S, DAUGAS E, ZERMATI Y, GUIDOTTI JE, HERMINE O, KROEMER G. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002; **100**: 1310–1317.

- [9] BROWN AS, MORO MA, MASSE JM, CRAMER EM, RADOMSKI M, DARLEY-USMAR V. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 1998; **40**: 380–388.
- [10] BROWN SB, CLARKE MCH, MAGOWAN L, SANDERSON H, SAVIL J. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase independent cell clearance program. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5987–5996.
- [11] CLARKE MCH, SAVILL J, JONES DB, NOBLE BS, BROWN SB. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol* 2003; **160**: 577–587.
- [12] COHEN Z, WILSONC J, RITTERB L, MCDONAGHA P. Caspase inhibition decreases both platelet phosphatidylserine exposure and aggregation. Caspase inhibition of platelets. *Thromb Res* 2004; **113**: 387–393.
- [13] CRAMER EM. Platelets and megakaryocytes: anatomy and structural organization. W: RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes, JN George [red.] Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. Lippincott Williams and Wilhins. Philadelphia, USA, Chapter 22, 2001: 411–428.
- [14] CRIST SA, ELZEY BD, LUDWIG AT, GRIFFITH TS, STAACK JB, LENTZD SR, RATLIFF TL. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 2004; **32**: 1073–1081.
- [15] DECKHUZYEN MC. Über die Thrombocyten (Blutplättchen). *Anat Anz* 1901; **19**: 529.
- [16] DEL PRINCIPE D, MENICHELLI A, DE MATTEIS W, DI CORPO ML, DI GIULIO S, FINAZZI-AGRO AF. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Lett* 1985; **1**: 142–149.
- [17] DEL PRINCIPE D, MENICHELLI A, DE MATTEIS W, DI GIULIO S, GIORDANI M, SAVINI I, FINAZZI-AGRO AF. Hydrogen peroxide is an intermediate in the platelet activation cascade triggered by collagen, but not by thrombin. *Thromb Res* 1991; **62**: 365–371.
- [18] FINAZZI-AGRO AF, MENICHELLI A, PERSIANI M, BIANCINI G, DEL PRINCIPE D. Hydrogen peroxide release from human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982; **718**: 21–25.
- [19] FORDE RC, FITZGERALD DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 1997; **95**: 787–789.
- [20] GOLDKORN T, BALABAN N, SHANNON M, CHEA V, MATSUKUMA K, GILCHRIST D, WANG H, CHAN C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate ceramide signalling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 1998; **111**: 209–322.
- [21] GUNSON H, HOLME S, HEATON A. *In vitro* platelet ageing at 22 degrees C is reduced compared to *in vivo* ageing at 37 degrees C. *Br J Haemat* 1995; **91**: 212–218.
- [22] HAMPTON MB, ORRENIUS S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 1997; **414**: 552–556.
- [23] ITALIANO JE, LECINE P, SHIVDASANI RA, HARTWIG JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999; **147**: 1299–1312.
- [24] IULIANO L, COLAVITA AR, LEO R, PRACTICO D, VIOLI F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Rad Biol Med* 1997; **22**: 999–1006.
- [25] IULIANO L, PEDERSEN JZ, PRACTICO D, ROTILIO G, VIOLI F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 695–704.
- [26] JAHN B, HANSCH GM. Oxygen radical generation in human platelets: dependence of 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; **93**: 73–79.
- [27] KALUZHNY Y, RAVID K. Role of apoptotic processes on platelet biogenesis. *Acta Haematol* 2004; **111**: 67–77.
- [28] KROLL MH, SCHAFFER AJ. The analysis of ligand-receptor interaction in platelet activation. *Immunopharmacology* 1995; **29**: 31–65.
- [29] KUTER DJ. Apoptosis in platelets during *ex vivo* storage. *Vox Sang* 2002; **83**: 311–333.
- [30] LAI M, RUMI C, D'ONOFRIO G, PUGGIONI PL, MENICHELLA G. Phosphatidylserine exposure in platelet concentrates during the storage period: differences between the platelets collected with different cell separators. *Transfus Apheresis Sci* 2002; **27**: 239–245.
- [31] LEO R, GHISELLI A, IULIANO L, VIOLI F. Role of hydroxyl radicals by the salicylate bis-hydroxylation during arachidonic acid-dependent platelet activation. *Thromb Haemost* 1995; **73**: A–47.
- [32] LEVY-TOLEDANO S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a hierarchy? *Haemost* 1999; **29**: 4–15.



- [33] LEYTIN V, ALLEN DJ, MYKHAYLOV S, MIS L, LYUBIMOV EV, GARVEY B, FREEDMAN J. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; **320**: 303–310.
- [34] LEYTIN V, FREEDMAN J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus Apheresis Sci* 2003; **28**: 285–295.
- [35] LI J, KUTER DJ. The end is just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release. *Int J Hematol* 2001; **74**: 365–374.
- [36] LI J, XIA Y, BERNITO AM, COBURN JP, KUTER DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion* 2000; **40**: 1320–1329.
- [37] LUFRANO M, BALAZY M. Interactions of peroxynitrite and other nitrating substances with human platelets: the role of glutathione and peroxynitrite permeability. *Biochem Pharmacol* 2003; **65**: 515–523.
- [38] MARCUS AJ, SILK ST, SAFIER LB, ULLMANN HL. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest* 1997; **59**: 149–158.
- [39] MARESCA M, COLAO C, LEONCINI G. Generation of hydrogen peroxide in resting and activated platelets. *Cell Biochem Funct* 1992; **10**: 79–82.
- [40] MATSUBAYASHI H, WEIDNER J, MIRAGLIA CC, MCINTYRE JA. Platelet membrane early activation markers during prolonged storage. *Thromb Res* 1999; **93**: 151–160.
- [41] MEHTA JL, CHEN LY, KONE BC, MEHTA P, TURNER P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995; **125**: 370–377.
- [42] MORO MA, DARLEY-USMAR VM, GOODWIN DA, READ NG, ZAMORA-PINO R, FEELISCH M, RADOMSKI MW, MONCADA S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrate on human platelets. *Pharmacology* 1994; **91**: 6702–6706.
- [43] MORO MA, DARLEY-USMAR VM, LIZASOAIN I, SU Y, RADOMSKI WM, MONCADA S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol* 1995; **116**: 1999–2004.
- [44] MOTOYAMA N, KIMURA T, TAKAHASHI T, WATANABE T, NAKANO T. Bcl-X<sub>L</sub> prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med* 1999; **189**: 1691–1698.
- [45] OLAS B, WACHOWICZ B. Aktywacja płytek krwi; Mechanizm przekazywania sygnałów. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 359–378.
- [46] OLAS B, WACHOWICZ B. Rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 325–337.
- [47] PEDRENO J, MONCUSÍ M, CABRÉ A, MASANA L. A new mechanism for platelet formation. *Atherosclerosis* 2000; **151**: 2–3.
- [48] PEREIRA J, SOTO M, PALOMO I, OCQUETEAU M, COETZEE L-M, ASTUDILLO S, ARANDA E, MEZZANO D. Platelet aging *in vivo* is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 905–909.
- [49] PERROTTA PL, PERROTTA CL, SNYDER EL. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion* 2003; **43**: 526–535.
- [50] PIQUET PF, KAN CD, VESIN C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* 2002; **7**: 91–98.
- [51] PIQUET PF, VESIN C, KAN CD. Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics. *Cytokine* 2002; **18**: 222–230.
- [52] PIQUET PF, VESIN C. Modulation of platelet caspases and life-span by anti-platelet antibodies in mice. *Eur J Haematol* 2002; **68**: 253–261.
- [53] PLENCHETTE S, MOUTET M, BENGUELLA M, N'GONDARA JP, GUIGNER F, COFFEE C, CORCOS L, BETTAIEB A, SOLARY E. Early increase in DcR2 expression and late activation of caspases in the platelet storage lesion. *Leukemia* 2001; **15**: 1572–1581.
- [54] RYNINGEN A, HOLMSEN H. W: Gundu H., Rao R. [red.] Platelet Physiology and Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Norwell, 1999: 1–22.
- [55] SALVEMINI D, BOTTING R. Modulation of platelet function by free radicals and free radicals scavengers. *TIPS* 1993; **14**: 36–42.
- [56] SANZ C, BENET I, RICHARD C, BADIA B, ANDREU EJ, PROSPER F, FERNANDEZ-LUNA JL. Antiapoptotic protein Bcl-X<sub>L</sub> is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol* 2001; **29**: 728–735.

- [57] SCHICK PK. W: RW. Colman, J. Hirsh, VJ. Marder, AW. Clowes, JN. George [red.] Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. 4th Edition, Lippincott Williams and Willins, Philadelphia, USA, 2001: 521–532.
- [58] SEGATCHIAN J, KRAILADSIRI P. Platelet storage lesion and apoptosis: are they related? *Transfus Apheresis Sci* 2001; **24**: 103–105.
- [59] SHCHERBINA A, REMOLD-O'DONNELL E. Role of caspases in a subset of human platelet activation responses. *Blood* 1999; **93**: 4222–4231.
- [60] SMUGAR J. Rozpoznanie i usuwanie komórek apoptotycznych przez profesjonalne fagocyty. *BioInfo publications*; <http://bioinfo.mol.uj.pl>, 2004
- [61] STASSEN JM, ARNOUT J, DECKMYN H. The hemostatic system. *Curr Med Chem* 2004; **11**: 2245–2260.
- [62] TESTA U. Platelet formation: a link between apoptosis and differentiation. *Blood* 2002; **100**: 1111–1112.
- [63] TONON G, JUO X, GRECO NJ, CHEN W, SHI Y, JAMIESON GA. Weak platelet agonists and U46619 induce apoptosis-like events in platelets, in the absence of phosphatidylserine exposure. *Thromb Res* 2002; **107**: 345–350.
- [64] VANAGS DM, ORRENIUS S, AGUILAR-SANTELIES M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Br J Haematol* 1997; **99**: 824–831.
- [65] VIOLI F, GHISELLI A, IULIANO L, ALESSANDRI C, CORDOVA C, BALSANO F. Influence of hydroxyl radical scavengers on platelet function. *Haemost* 1988; **18**: 91–98.
- [66] WACHOWICZ B, OLAS B, ŻBIKOWSKA HM, BUCZYŃSKI A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; **13**: 175–182.
- [67] WADHAWAN V, KARIM ZA, MUKHOPADHYAY S, GUPTA R, DIKSHIT M, DASH D. Platelet storage under *in vitro* condition is associated with calcium-dependent apoptosis-like lesions and novel reorganization in platelet cytoskeleton. *Arch Biochem Biophys* 2004; **422**: 183–190.
- [68] WOLF BB, GOLSTEIN JC, STENNICE HR, BEERE H, AMARANTE-MENDES GP, SALVESAN GS, GREEN DR. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood* 1999; **94**: 1683–1692.
- [69] WU K. Platelet activation mechanisms and marker in arterial thrombosis. *J Intern Med* 1996; **239**: 17–34.
- [70] WU KK, KU CSL. Effect of platelet activation on the platelet surface sialic acid. *Thromb Res* 1979; **14**: 697–704.
- [71] ZAULI G, VITALE M, FALCIERI E, GIBELLINI D, BASSINI A, CELEGHINI C, COLUMBARO M, CAPITANI S. *In vitro* senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 1997; **90**: 2234.
- [72] ZHOU Q, HELLERMAN GR, SOLOMONSON LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res* 1995; **77**: 87–96.
- [73] ZWAAL RF, SCHROIT AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; **89**: 1120–1121.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.05. 2006 r.

Przyjęto: 19.07. 2006 r.

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

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

**REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO, PROCESU APOPTOZY, WYDZIELANIA CYTOKIN I CZĄSTECZEK ADHEZYJNYCH W LIMFOCYTACH T I INNYCH KOMÓRKACH KRWI OBWODOWEJ ORAZ KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH W MECHANIZMIE AKTYWACJI *TOLL-LIKE RECEPTORS* (TLRs) I RODZINY CZĄSTECZEK TRANSKRYPCYJNEGO CZYNNIKA JĄDROWEGO NF- $\kappa$ B**

REGULATION OF CELL-CYCLE PROCESS, CELL APOPTOSIS, CYTOKINES AND ADHESION MOLECULES PRODUCTION IN LYMPHOCYTES T AND OTHER BLOOD CELLS AND NEOPLASM CELLS IN MECHANISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND TRANSCRIPTION NUCLEAR FACTOR NF- $\kappa$ B FAMILY ACTIVATION

Katarzyna STARSKA, Marek ŁUKOMSKI

Katedra Otolaryngologii, Klinika Laryngologii i Onkologii Laryngologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*Strzeszczenie:* *Toll-like receptors* (TLRs), receptory dla TNF (TNF-R), NF- $\kappa$ B oraz białka biorące udział w aktywacji transkrypcyjnego czynnika jądrowego mogą wpływać na zjawisko apoptozy, cykl komórkowy, wydzielanie cytokin oraz cząsteczek adhezyjnych za pośrednictwem regulacji transkrypcji określonych genów, które determinują przebieg tych procesów zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej. Celem pracy jest przedstawienie najnowszej wiedzy dotyczącej roli TLRs oraz rodziny cząsteczek NF- $\kappa$ B w regulacji tych zjawisk. W pracy przedstawiono: charakterystykę rodziny *Toll-like receptors* (TLRs) oraz ich rolę w kaskadzie zjawisk prowadzących do aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B, najważniejsze mechanizmy aktywacji transkrypcji określonych genów kodujących białka uczestniczące w cyklu komórkowym (m.in. cyklina D1, p16INK4A, GADD45), zjawisku apoptozy (m.in. TNF-R, XIAP, cIAP1,2, Bcl-XL) oraz onkogenezie (m.in. p53, VCAM, ICAM, cytokiny) za pośrednictwem TLRs i NF- $\kappa$ B. Poznanie mechanizmów regulacyjnych szlaku TLRs i TNF-R  $\rightarrow$  białka pośredniczące  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  ekspresja genów  $\rightarrow$  produkt ekspresji stwarza w przyszłości możliwość wpływania na proces aktywacji wybranych czynników antyneoplastycznych i zablokowania cząsteczek proneoplastycznych pojawiających się zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej, co być może będzie początkiem nowego podejścia do walki z rozwijającą się chorobą nowotworową oraz da szansę na wprowadzenie nowych metod postępowania leczniczego (immunoterapia, nowe kryteria rozległości zabiegów operacyjnych).

**Słowa kluczowe:** komórki krwi, komórki nowotworowe, TLRs, transkrypcyjny czynnik jądrowy NF- $\kappa$ B, apoptoza, cykl komórkowy, cytokiny, cząsteczki adhezyjne.

**Summary:** Toll-like receptors (TLRs), TNF receptor (TNF-R), NF- $\kappa$ B and the nuclear factor NF- $\kappa$ B family could influence cell-cycle progression, cell apoptosis, cytokines and adhesion molecules by regulation of proper genes which determine these process in neoplasm cells and blood cells. The aim of this study was to introduce the latest knowledge of the nuclear factor NF- $\kappa$ B family role in oncogenesis and neoplasm progression. In this study the characterization of Toll-like receptors family and role in nuclear factor NF- $\kappa$ B family activation, regulatory mechanisms of transcription genes of cell-cycle progression (e.g. cyclin D1, p16INK4A, GADD45), cell apoptosis apoptozy (e.g. TNF-R, XIAP, cIAP1,2, Bcl-XL) and oncogenesis (e.g. p53, VCAM, ICAM, cytokines) which determine these processes in neoplasm cells were introduced. Knowledge of mechanisms of activation by TLRs and TNF-R  $\rightarrow$  intermediary proteins  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  cell-cycle, apoptosis, cytokines and adhesion molecules genes  $\rightarrow$  product of expression, could allowe to activate antineoplastic fators and blocked proneoplastic molecules and use new therapeutic methods (immunotherapy, new criterions for operations).

**Key words:** blood cells, neoplasm cells, Toll-like receptors (TLRs), transcription nuclear factor NF- $\kappa$ B, cell apoptosis, cell-cycle process, cytokines, adhesion molecules.

Pomimo braku bezpośrednich dowodów na to, iż komórki nadzoru immunologicznego chronią przed rozwojem nowotworu, pośrednie obserwacje kliniczne oraz badania doświadczalne wskazują na ich aktywność w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym różnego pochodzenia. Niewiele wiadomo również na temat wpływu komórek guza na aktywność komórek krwi krążącej, tj. limfocytów T, komórek NK, monocytów i neutrofilów, wzajemnego modulowania funkcji oraz regulację przeciwnowotworową odpowiedzi immunologicznej w mechanizmie aktywacji *Toll-like receptors* (TLRs), receptorów dla TNF (TNF-R) i rodziny cząsteczek transkrypcyjnego czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B. TLRs, TNF-R, NF- $\kappa$ B oraz białka biorące udział w aktywacji tych cząsteczek mogą wpływać na zjawisko apoptozy, cykl komórkowy, wydzielanie cytokin oraz cząsteczek adhezyjnych za pośrednictwem regulacji transkrypcji określonych genów, które determinują przebieg tych procesów zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej. Dokładne poznanie mechanizmów regulacyjnych szlaku TLRs i TNF-R  $\rightarrow$  białka pośredniczące  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  ekspresja genów związanych z apoptozą, cyklem komórkowym, wydzielaniem cytokin i cząsteczek adhezyjnych  $\rightarrow$  produkt ekspresji stwarza w przyszłości możliwość wpływu na proces aktywacji wybranych czynników antyneoplastycznych i zablokowanie cząsteczek proneoplastycznych pojawiających się zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej, co być może będzie początkiem nowego podejścia do walki z rozwijającą się chorobą nowotworową oraz da szansę na wprowadzenie nowych metod postępowania leczniczego.

Celem pracy jest przedstawienie najnowszej wiedzy dotyczącej roli *Toll-like receptors* TLRs oraz rodziny cząsteczek NF- $\kappa$ B i białek biorących udział w aktywacji transkrypcyjnego czynnika jądrowego w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i produkcji cząsteczek adhezyjnych w onkogenezie i progresji nowotworu.

## I. CHARAKTERYSTYKA RODZINY TLRs

Rodzina *Toll-like receptors* (TLRs) odgrywa fundamentalną rolę w aktywacji procesów wrodzonej odporności [71,75]. Do tej pory w błonach komórkowych (*transmembrane receptors*) populacji ludzkich leukocytów stwierdzono i opisano ekspresję 10 rodzajów tych receptorów [4]. Wszystkie TLRs charakteryzują się obecnością wielokrotnych powtórzeń fragmentów bogatych w leucynę (LRRs) w części zewnątrz błonowej receptora oraz domeny wewnątrz błonowej będącej homologiem IL-1R (TIR), dlatego też TLRs zaliczane są do superrodziny białek IL-1R [105]. Obecność TLR1 została potwierdzona na powierzchni wszystkich ludzkich leukocytów, tj. monocytów, limfocytów T i B, komórek NK oraz na komórkach wielojądrzastych, jak również w błonach komórek nabłonkowych [72]. Występowanie TLR2, TLR4 i TLR5 wykazano natomiast na komórkach szeregu mielomonocytnego. TLR3 wyodrębniono na komórkach dendrytycznych oraz limfocytach w węzłach chłonnych [71]. Pozostałe receptory TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 mogą występować również w błonach ludzkich leukocytów, rozpoznając specyficzne ligandy m.in. cząsteczki wirusów (TLR5, TLR7), CpG DNA komórek bakterii (TLR9) [75]. Badania Nishimura i wsp. [75], w których autorzy oceniali mRNA dla TLRs, potwierdziły występowanie tych receptorów w błonach komórkowych wielu tkanek. Największą ekspresję mRNA TLR1 wykazano w płucach, śledzionie i nerkach [75]. Rock i Matsuguhi [67,72] stwierdzili występowanie TLR2 w mózgu, sercu i mięśniach, jak również w płucach i śledzionie. Ekspresja mRNA dla TLR7 i TLR8 była największa w płucach, śledzionie i rdzeniu kręgowym [22]. Ekspresję TLRs potwierdzono również w błonach komórkowych nabłonków różnego pochodzenia, w tym komórkach raków płaskonabłonkowych głowy i szyi, raka pęcherzyka żółciowego i prostaty [63,94].

Regulacja ekspresji LTRs w błonach komórkowych pozostaje nadal w piśmiennictwie przedmiotem licznych dyskusji. Ekspozycja komórek na działanie wielu cząsteczek m.in. prozapalnych cytokin (m.in. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), przeciwzapalnych cząsteczek (IL-10), lipopolisacharydów (LPS) zwiększa ekspresję LTR4 na monocytach i komórkach wielojądrzastych, podczas gdy IL-10 blokuje ten efekt [71]. Liczne badania potwierdziły działanie prozapalnych cytokin, które indukowały transkrypcję TLR4 [71]. Badania Muzio i wsp. [71] wykazały, że obecność LPS lub IL-10 w środowisku komórek całkowicie blokuje aktywację TLR4 na powierzchni ludzkich monocytów i jednocześnie pozostaje bez wpływu na ekspresję TLR2. Autorzy nie potwierdzili aktywacji TLR1 za pośrednictwem lipopolisacharydów lub cytokin, z wyjątkiem ujemnego wpływu na transkrypcję receptora w limfocytach T stymulowanych mitogenem (PHA) i braku ekspresji TLR2, TLR4 i TLR5 na tych komórkach. W badaniach z wykorzystaniem technik biologii molekularnej stwierdzono, że LTR4 stanowi niezbędny składnik kompleksu receptorowego aktywowanego przez LPS i kontrolującego przebieg zjawisk wrodzonej odpowiedzi immunologicznej *in vivo* [21,41,82]. Inni przedstawiciele rodziny TLRs, m.in. TLR2, mogą również wpływać na zwiększoną wrażliwość komórek na inne cząsteczki występujące w ich środowisku, np. peptydoglikany, zymosan, składniki ściany bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus aureus* [97,98]. Wyniki

TABELA I. Wybrane cząsteczki związane z aktywacją rodziny *Toll-like receptors* (TLRs)

Intracellular adhesion molecule	ICAM1, CD54
Myeloid differentiation primary response gene (88)	MyD88
Suppressor of cytokine signaling 1	SOCS1
Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, 2, 3, 4	IRAK 1, 2, 3, 4
TNF receptor-associated factor 6	TRAF6
NF- $\kappa$ B – inducing kinase	NIK
Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1	MEKK1
Janus kinase	JAK
Signal transducer and activator of transcription	STAT
TIR-containing adaptor-inducing interferon	TRIF
TRIF-related adaptor molecule	TRAM
Mitogen-activated protein	MAP

badan przedstawione w dostępnym piśmiennictwie wskazują na możliwość aktywacji TLRs drogą bezpośrednią (LPS) lub za pośrednictwem cytokin [21,41,71,97,98]. Potwierdza się również wspólne oddziaływanie receptorów rodziny TLRs. Badania Takeuchi i wsp. [96] wykazały, że koekspresja TLR1 hamuje odpowiedź związaną z pobudzeniem TLR2, podczas gdy wspólne występowanie w błonie komórkowej receptorów TLR1 i TLR6 nasila pobudzenie receptora TLR6. Również obecność w środowisku komórek nabłonkowych, czynników prozapalnych jest przyczyną regulacji miejscowej ekspresji TLRs. Abreu i wsp. [2] wykazali wpływ IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  na ekspresję mRNA TLR4 w komórkach nabłonka jelita cienkiego. Obecność tych cytokin w środowisku komórek jelita wiązała się ze wzmożoną ekspresją TLR4, co dowodzi znaczenia cytokin szeregu Th1 w nasilaniu zmian zapalnych przez aktywację TLRs [2].

## II. ROLA RODZINY TLRs W KASKADZIE ZJAWISK PROWADZĄCYCH DO AKTYWACJI CZYNNIKA NF- $\kappa$ B

W licznych badaniach potwierdzono znaczenie pobudzenia receptorów TLRs w kaskadzie zjawisk aktywującej czynnik *NF- $\kappa$ B*. Najlepiej poznanymi są receptory TLR2 i TLR4, które aktywują *NF- $\kappa$ B*, indukują ekspresję IL-1, IL-6, IL-8 i cząsteczki kostymulatora B7 [5,14,47,69]. Podczas aktywacji TLRs tworzą homodimery, co powoduje charakterystyczne zmiany konformacyjne domeny TIR i prowadzi do aktywacji cząsteczki adaptacyjnej MyD88 [5,77]. Domena śmierci białka MyD88 aktywuje IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) poprzez przyłączenie do receptorowego kompleksu [77]. IRAK następnie ulega autofosforylacji, odłącza się od kompleksu i pobudza TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), co aktywuje kolejne kinazy, tj. NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) i MEKK1 (*mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1*) [52]. Dokładny mechanizm tej aktywacji nie jest dokładnie poznany. TRAF6 ma zdolność interakcji z innym białkiem (ESCIT), które pomaga w przejściu MEKK1 w aktywną

formę, podczas gdy NIK może ulec pobudzeniu przez TAK1 (*TGFβ activated kinase*) [55]. TAK 1 wiąże się z TRAF6 poprzez proteiny TAB1 i TAB2. Częsteczki NIK i MEKK1 mają zdolność aktywacji kompleksu IKK (*IκB kinase*) [74,95]. Ostatecznie IκB ulega fosforylacji i degradacji, co prowadzi do translokacji NF-κB i transkrypcji genów. Czynniki NF-κB za pośrednictwem TLRs może ulec także aktywacji przy udziale MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), która rozpoczyna kaskadę zdarzeń prowadzącą do transkrypcji TNFα oraz grupy białek zwanych SOCS (*suppressor of cytokine signaling*). SOCS stanowią klasę negatywnych regulatorów dla JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) i hamują szlak związany z pobudzeniem receptorów TLRs [9].

### III. CHARAKTERYSTYKA RODZINY CZĄSTECZEK TRANSKRYPCYJNEGO CZYNNIKA JĄDROWEGO NF-κB

NF-κB/Rel to rodzina białek będących aktywatorami transkrypcji [7,8,10,34,92,101]. Obejmuje ona białka strukturalnie podobne (u ssaków 5 rodzajów), takie jak: NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, c-Rel, które wiążą się z DNA jako homo- lub heterodimery i których aktywność jest regulowana przez białka z rodziny IκB (IκB-α, IκB-β, IκB-c, p105, p100) [18]. Wszystkie białka rodziny NF-κB mają homologiczną Rel domenę odpowiedzialną za łączenie się z DNA, dimeryzację i interakcję z IκB [18]. Najlepiej scharakteryzowanym heterodimerem, określanym jako NF-κB jest p50/RelA. Zbudowany jest on z dwóch podjednostek: białka p50, będącego produktem genu NF-κB1 i białka p65, stanowiącego produkt genu RelA [34]. NF-κB/Rel odpowiedzialny jest za aktywację transkrypcji genów w odpowiedzi na obecność w środowisku pozakomórkowym: cytokin (np. TNFα), mitogenów (np. PHA, anti-CD3, anti-CD2) oraz bakterii (enterotoksyny *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*), wirusów (HBV, HTLV-1), leków (np. cykloheksamid) i wielu innych czynników [7,8,10,34,83,92,101]. Również jednym z mechanizmów aktywujących NF-κB jest stres oksydacyjny [83]. Do genów aktywowanych przez NF-κB należą m.in. geny dla cytokin (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNFα, LTα/β), czynników wzrostu (GM-CSF), immunoreceptorów (MHC), molekuł adhezyjnych (ICAM, VCAM, ELAM), białek ostrej fazy (SAA), enzymów (iNOS, COX-2), wirusów i wielu innych białek biorących udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej (TGF-beta 1), procesów zapalnych, w kontroli cyklu komórkowego i apoptozy oraz onkogenezy (cIAP1, cIAP2, FasL, c-myc, p53, Cyklina D1) [7,8,10,18,34,48]. NF-κB odpowiedzialny jest także za inicjację m.in. transkrypcji genów chroniących komórkę przez apoptozą lub genów zwiększających oporność komórek guza na stosowane leczenie przeciwnowotworowe [16,31,78,80,101]. We wszystkich komórkach z wyjątkiem limfocytów B nieaktywny NF-κB występuje w cytoplazmie w połączeniu z białkiem IκB [7,10,34,92]. Aktywacja NF-κB występująca w odpowiedzi na zadziałanie sygnału pozakomórkowego polega na translokacji NF-κB z cytoplazmy do jądra komórkowego [28,34]. IκB, ulegający fosforylacji przez IKKα/β

(*IκB kinase*), hamuje aktywność heterodimeru p50/RelA utrzymując go w cytoplazmie i uniemożliwiając jego wiązanie z DNA [18]. W odpowiedzi na sygnał pozakomórkowy np. TNF $\alpha$  (p55) dochodzi do fosforylacji reszt serynowych IκB, ubikwitinizacji i jego degradacji. Odłączenie IκB i uwolnienie NF-κB pozwala na translokację NF-κB z cytoplazmy do jądra komórkowego, wiązanie z DNA i aktywację odpowiednich genów m.in. genów dla mediatorów zapalenia, karcynogenezy, pro- i antyapoptotycznych regulatorów oraz genów dla IκB [18]. Nowo zsyntetyzowany IκB łączy się w jądrze komórkowym z NF-κB (p50/RelA) i transportuje go z powrotem do cytoplazmy [34]. Nakayama i wsp. [73] podkreślają znaczenie IKK $\alpha$  jako wewnątrzkomórkowego sygnału hamującego różnicowanie komórek nabłonkowych w rakach płaskonabłonkowych, sugerując znaczącą rolę kinazy C – PKC (*protein C kinase*). Według autorów aktywacja kinazy C indukuje wzrost aktywności transkrypcyjnej NF-κB.

### Rola NF-κB w aktywacji apoptozy

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki jest szczególnym mechanizmem eliminowania, tj. samounicestwienia komórek, które stanowią potencjalne lub rzeczywiste zagrożenie. Apoptoza występuje zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Układ regulacyjny apoptozy obejmuje dwa zasadnicze mechanizmy kontroli. Jeden podlega białkom z rodziny Bcl-2/Bax [40,57,84,85,103,104], drugi kontrolowany jest przez kaspazy [20,57,58,66]. Sygnałem do rozpoczęcia apoptozy może być zadziałanie czynników tak pozakomórkowych, jak i wewnątrzkomórkowych [6,35]. Zainicjowanie apoptozy może wiązać się z pobudzeniem receptora Fas/APO-1/CD95, receptora dla TNF (TNFR-1), receptora dla NGF (NGFR), CD30, CD40, OX40, 4-1BB, które mają części zwane domenami śmierci (DD – *death domain*). Receptory te przekazują sygnał apoptotyczny aktywujący prokaspazy, głównie kaspazę-8. W końcowym etapie apoptozy dochodzi do zmian nieodwracalnych w komórce, m.in. fragmentacji DNA i dezintegracji jądra komórkowego [18]. Sygnałem do rozpoczęcia apoptozy może być uszkodzenie DNA komórki prowadzące do wzrostu ilości białka p53 [18,62]. Wzrost ilości białka p53 poprzez p21 aktywuje geny hamujące proliferację i doprowadza do zatrzymania komórki w fazie G<sub>1</sub> na okres potrzebny do naprawy DNA [57,62,84]. Gdy naprawa DNA nie jest możliwa, p53 kieruje komórkę na drogę apoptozy poprzez aktywowanie transkrypcji Bax i jego translokację z cytoplazmy do mitochondrium [102]. Regulacja apoptozy na poziomie mitochondrium związana jest z działaniem białek promujących apoptozę, tj. Bax, Bak, Bad, Bcl-X<sub>s</sub> oraz białek hamujących apoptozę, tj. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>. Łączą się one w homo- i heterodimery tworząc kanały w błonie mitochondrialnej, które odgrywają istotną rolę w kontroli zmian międzybłonowego potencjału mitochondrialnego [51]. Przesunięcie równowagi w stronę białek promujących apoptozę doprowadza do otwarcia kanałów i ucieczki do cytoplazmy cytochromu c, jonów Ca<sup>2+</sup>, wody i czynnika indukującego apoptozę (AIF – *apoptosis inducing factor*), białka Diablo/Smac [61,99]. Uwolniony cytochrom c rozpoczyna reakcje kaskadową aktywując Apaf-1 (*Apoptosis activation factor*), który dalej aktywuje kaspazę-9 i kaspazę-3. Kaspaza-3 odpowiedzialna jest za proteolizę białek, tj. PAK (p21-*activated kinases*), pRb, białek cytoszkieletu [20,57,61]. Proteina Diablo/Smac uwolniona z



mitochondrium promuje proces apoptozy poprzez przyłączenie się do cząsteczek XIAP, cIAP1 i cIAP2 umożliwiających aktywację kaspaz [99]. Sygnał ten również aktywuje kaspazę-8, a następnie kaspazę-9 i kaspazę-3.

Rola rodziny białek NF- $\kappa$ B w regulacji procesu apoptozy jest nadal dyskutowana. Antyapoptotyczne działanie NF- $\kappa$ B uwidacznia się poprzez m.in. pobudzenie receptora dla TNF $\alpha$  (TNF-R) aktywującego NF- $\kappa$ B, który indukuje transkrypcję i ekspresję inhibitorów kaspaz, tj. XIAP, cIAP1 i cIAP2 oraz aktywuje Bcl-X<sub>L</sub> i Bfl-1 [26,59,79,83,84]. Innym przykładem aktywacji procesu apoptozy związanego z pobudzeniem białka NF- $\kappa$ B jest wzrost ekspresji proteiny, biorącej udział w regulacji cyklu komórkowego, tj. cykliny D1 [37,38,50]. Antyapoptotyczne działanie czynnika jądrowego uwidacznia się również poprzez aktywację cząsteczek TRAF1 i TRAF2 [100]. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć prace potwierdzające znaczenie rodziny białek NF- $\kappa$ B w promowaniu procesu apoptozy w różnych typach komórek [3,12]. Jednym z mechanizmów pobudzenia zjawisk prowadzących do apoptozy jest wpływ NF- $\kappa$ B na wzrost ekspresji genów dla TNF $\alpha$  oraz c-myc [42,68]. Kaur i wsp. [54] potwierdzili w badaniach dotyczących raka wątroby, że NF- $\kappa$ B przeciwdziała aktywności TGF- $\beta$  1, indukującego proces apoptozy poprzez wzmożoną ekspresję genów i produkcję XIAP i Bcl-X(L). Wiele badań wskazuje także na rolę NF- $\kappa$ B w promowaniu apoptozy poprzez pobudzenie transkrypcji receptora FasL [46,53]. Niektórzy badacze nie potwierdzają jednak możliwości aktywacji apoptozy przez NF- $\kappa$ B za pośrednictwem ekspresji genu dla FasL [60,86,87]. Rodrigez i wsp. [87] nie zaobserwowali jednak korelacji ekspresji NF- $\kappa$ B i receptora Fas w guzach regionu głowy i szyi. W regulacji procesu apoptozy ważną rolę odgrywają również wzajemne oddziaływania białek biorących udział w kaskadzie programowanej śmierci komórki. Przykładem jest opisywane w literaturze, potencjalne znaczenie proteiny p53 w aktywności NF- $\kappa$ B. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć prace, które dowodzą istnienia kompetycyjnego współzawodnictwa między NF- $\kappa$ B a p53 o możliwość przyłączenia do koaktywatora p300 [99]. Praca Liu i wsp. [64] potwierdza antagonistyczne działanie p53 w stosunku do NF- $\kappa$ B. Autorzy podkreślają znaczenie enzymu – kinazy fosforyzującej p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, który może fosforylować również karboksylowy koniec cząsteczki I $\kappa$ B- $\alpha$ . Również Gurowa i wsp. [36], analizując wyniki badań dotyczących raka nerki, sugerują możliwość występowania zjawiska inhibicji NF- $\kappa$ B i jednoczesnej aktywacji p53, co może prowadzić do nasilonej apoptozy. Inne doniesienia nie potwierdzają tych spostrzeżeń. Ryan [88] i Perkins [81] dowodzą, że białko p53 może aktywować NF- $\kappa$ B za pomocą nie do końca jeszcze poznanego, mechanizmu lub przez indukcję ekspresji białka p21<sup>Waf1</sup>, które hamuje cyklinę E/Dck2 i blokuje zdolność do łączenia się NF- $\kappa$ B z koaktywatorem p300 i CBP. Chen i wsp. [18] opisują inny mechanizm wzajemnego oddziaływania białek kaskady czynnika NF- $\kappa$ B. Autorzy podkreślają rolę kaspazy-3 w degradacji cząsteczki I $\kappa$ B, co powoduje łatwiejszą jej degradację przez enzymy proteasomów w odpowiedzi na działanie czynników indukujących NF- $\kappa$ B. Badacze podkreślają jednak możliwość przyłączenia i hamowania, również NF- $\kappa$ B. W tym mechanizmie geny antyapoptotycznych cząsteczek nie ulegają transkrypcji, a proces apoptozy nie jest hamowany [18]. Inni autorzy potwierdzają możliwość aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B przez kaspazy, pod pewnymi

warunkami. Chaudhary i wsp. [17] opisują rolę kaspazy-8, kaspazy-10 oraz MRIT w aktywacji zjawisk prowadzących do pobudzenia NIK i interakcji z  $IKK\alpha/\beta$  i co za tym idzie czynnika NF- $\kappa$ B. Przytoczone prace wskazują zatem, że regulacja pozytywna lub negatywna procesu apoptozy w drodze aktywacji rodziny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, jest procesem złożonym i zależy od przewagi czynników pobudzających lub hamujących ekspresję białek uczestniczących w kaskadzie opisywanych zjawisk.

### Rola NF- $\kappa$ B w regulacji cyklu komórkowego

Proliferacja kontrolowana jest na poziomie cyklu komórkowego przez szereg czynników ze środowiska zewnętrznego, jak i wewnętrznego. Motorem cyklu komórkowego są kompleksy cyklin z kinazami proteinowymi zwanymi kinazami zależnymi od cyklin (CDK – *cyclin-dependent kinases*) [13,24,27,43,44,91]. Zidentyfikowano 9 typów cyklin oznaczonych od A do I oraz 11 kinaz zależnych od cyklin. Ekspresja cyklin: B1, A, E, D jest periodyczna i występuje w ściśle określonych fazach cyklu. Kompleksy cyklin z kinazami zależnymi od cyklin fosforylują białka w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, umożliwiając przejście komórki z jednej fazy cyklu do drugiej, np. cyklina D (D1, D2, D3) wraz z CDK4 lub CDK6 jest odpowiedzialna za fosforylację pRb, uwolnienie czynników transkrypcyjnych (E2F, DPI 1-2), przejście komórki z fazy  $G_0$  do  $G_1$  i wejście komórki do fazy S. Aktywacja CDK zależy od przyłączenia cykliny, fosforylacji i defosforylacji oraz obecności inhibitorów. Inhibitory hamujące w sposób bezpośredni lub pośredni kompleksy cyklina/CDK podzielono na: INK4 – inhibitor CKD4, w skład którego wchodzi p15, p16, p18, p19 oraz CIP/KIP (*cyclin/kinase inhibitory proteins*) składające się z p21, p27, p57. Inhibitory z grupy INK4 działają wyłącznie na kompleks cykliny D z CDK4 lub CDK6. Inhibitory z grupy CIP/KIP mogą hamować funkcję kompleksów cykliny z CDK występujących w fazie  $G_1$  i S (cyklina D/CDK4, cyklina E/CDK2, cyklina A/CDK2) oraz w mniejszym stopniu cyklina B/CDK1 [13,24,27,43,44,91]. Dodatkową kontrolę sprawują białka z rodziny Rb oraz p53, których działanie polega na supresji proliferacji, np. p53 poprzez zwiększenie ekspresji p21 aktywuje geny hamujące proliferację doprowadzając do zahamowania cyklu komórkowego w fazie  $G_1/S$  i ewentualnie indukcji apoptozy w przypadku uszkodzenia DNA lub zahamowania cyklu w fazie  $G_2/M$ , gdy DNA nie ulegnie replikacji [13,24,25]. Udział białek z rodziny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w regulacji cyklu komórkowego polega na ułatwieniu przejścia z fazy  $G_1$  do S poprzez hamowanie aktywacji lub funkcji p53, jak również wzmoczonej ekspresji cykliny D1 [15,37,38,50]. NF- $\kappa$ B może też pobudzać przejście fazy  $G_2$  do M poprzez hamowanie ekspresji GADD45 (*DNA-damage protein 45*), białka blokującego kompleks cyklina B/CDK2 [18].

### Rola NF- $\kappa$ B w onkogenezie

Zdolność białek z rodziny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w supresji apoptozy oraz regulacji cyklu komórkowego wskazuje, że NF- $\kappa$ B może odgrywać istotną rolę w onkogenezie. Wzmoczona ekspresja NF- $\kappa$ B została potwierdzona w wielu rakach, m.in. raku piersi, płuca, tarczycy, prostaty, pęcherzyka żółciowego i wątroby, T i B białaczkach oraz rakach głowy i szyi [11,34,49,70,76,93]. Jiang i wsp. [49] wykazali wzmoczoną

ekspresję specyficznych sekwencji (-235/-266) w cząsteczce NF- $\kappa$ B w liniach komórkowych HepG2 raka wątroby. Wcześniejsze prace wskazują na rolę NF- $\kappa$ B w transformacji nowotworowej, co potwierdza fakt, że v-Rel, homolog c-Rel o właściwościach onkogenu powoduje transformację komórek ssaków *in vivo* [18]. Hamowanie aktywności NF- $\kappa$ B przez wzmożoną ekspresję I $\kappa$ B- $\alpha$ , powodowało rozrost komórek T białaczki i związane było z dłuższym przeżyciem transgenicznych myszy [18]. Geny kodujące c-Rel, NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), p65/RelA, Bcl-3 są ponadto zlokalizowane w tych regionach genomu, który związany jest m.in. ze zjawiskiem amplifikacji onkogenów. Zjawisko to potwierdzono w przypadkach chłoniaków nieziarniczych (*B non-Hodking lymphoma*), w wielu chłoniakach, w tym chłoniakach skóry oraz komórkach raków [18,34]. Inny mechanizm przedstawia Wadgaonkar i wsp. [100], którzy podkreślają znaczenie antagonistycznego działania NF- $\kappa$ B w stosunku do białka p53, jak i wzmożonej ekspresji cykliny D, co w rezultacie prowadzi do nieograniczonej proliferacji [15,37,-38,50]. Również wzmożona transkrypcja antyapoptotycznych genów dla cIAP1, cIAP2, XIAP, Bcl-X<sub>L</sub> aktywowana za pośrednictwem NF- $\kappa$ B dodatkowo sprzyja możliwości ucieczki mechanizmów zachodzących w komórce spod kontroli i w następstwie tego do zahamowania apoptozy [19]. Czynnikiem sprzyjającym onkogenezie jest także pozytywna regulacja ekspresji genów dla m.in. molekuł adhezyjnych, VEGF, COX-2, chemokin, które bezpośrednio nasilają proces angiogenezy [18]. Abdel i wsp. [1] podkreślają znaczenie regulacyjnej roli NF- $\kappa$ B w ekspresji genów dla cytokin m.in. IL-1 i IL-8 oraz enzymów, które uczestniczą w aktywacji zjawisk immunologicznych prowadzących do nasilenia procesu metaplastji i ontogenezy w gruczolakoraku przełyku.

#### IV. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH BIAŁEK AKTYWOWANYCH ZA POŚREDNICTWEM NF- $\kappa$ B

##### Cyklina D1

Cyklina D1 jest białkiem produkowanym w wyniku ekspresji genu, uważanego za protoonkogen, CCND1/PRAD1, który zlokalizowany jest na chromosomie 11 (11q13). Cyklina D1 zbudowana jest z 295 aminokwasów o m. cz. 36 kD i należy, wraz z cykliną E do cyklin fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego. Rolą cykliny D1 jest aktywacja kinaz białkowych serynowo-treoninowych cyklinozależnych CDK4 i CDK6. W fazie G<sub>1</sub> cyklu komórkowego kompleks cyklina D1/CDK4 (CDK6), poprzez fosforylację białka pRb wpływa na jego aktywność. Białko pRb reguluje m.in. proliferację komórek poprzez wpływ na prawidłowy przebieg fazy G<sub>1</sub> i przejście z fazy G<sub>1</sub> do fazy S. Odbywa się to poprzez oddziaływanie postaci ufosforylowanej białka pRb z czynnikiem transkrypcyjnym E2F i postaci ufosforylowanej tego białka z cząsteczką p16INK4A [24,29,32,39].

W komórkach licznych nowotworów stwierdza się nadekspresję cykliny D1, co spowodowane jest najczęściej amplifikacją lub translokacją genu *CCND1/PRAD1* [29,33]. Zaburzenia ekspresji genów regulujących przejście fazy G<sub>1</sub> do fazy S cyklu

komórkowego odgrywają kluczową rolę w transformacji nowotworowej komórki i występują w niemal wszystkich typach nowotworów występujących u człowieka [65].

### Białko p16INK4A

Białko p16INK4A jest kodowane przez gen *p16INK4A* (*cycli-dependent kinase-4-inhibitor*), który jest zlokalizowany na chromosomie 9 (9p21). Produkt białkowy tego genu zbudowany jest z 148 aminokwasów o m. cz. 15,8 kD i zaliczany jest do białek supresorowych. Białko p16INK4A tworzy kompleksy z kinazą CDK4 i CDK6, których jednostkami regulatorowymi są cykliny D. Podstawowa funkcja p16INK4A polega na konkurencyjnym wiązaniu CDK4 i CDK6 i tym samym hamowaniu fosforylacji białka pRb, przeprowadzanej przez cyklinozależne kinazy [23,24,30,39].

### Cytokiny

Rola limfocytów T cytotoksycznych (CTL – *cytotoxic lymphocytes*) polega na odróżnianiu i zabijaniu komórek potencjalnie nowotworowych. Limfocyty cytotoksyczne to w większości limfocyty CD8+, które poprzez swoisty receptor TCR (*T Cell Receptor*) mają zdolność rozpoznawania antygeny nowotworowego obecnego na cząsteczce MHC klasy I. Aktywacja limfocytów T cytotoksycznych CD8+ odbywa się z udziałem uprzednio pobudzonych limfocytów T pomocniczych CD4+ [56]. Pobudzenie limfocytu T pomocniczego CD4+ wymaga bezpośredniego kontaktu z komórką prezentującą antygen APC (makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK), co powoduje pobudzenie limfocytu Th i uwalnianie przez niego do środowiska szeregu cytokin, m.in. IL-2, ale również ekspresję receptorów dla IL-2 i cząsteczek adhezyjnych, np. LFA-1. Wśród cytokin zasadnicze znaczenie ma IL-2, która w drodze autokrynej stymuluje limfocyt Th do ostatecznego różnicowania i proliferacji. Aktywacja limfocytów Th może prowadzić do śmierci limfocytu poprzez apoptozę, anergii, czyli tolerancji immunologicznej lub proliferacji i różnicowania komórek. Pobudzone limfocyty Th mają zdolność do produkowania szeregu cytokin, różnych w zależności od rodzaju subpopulacji limfocytów Th (Th1 i Th2). Największe znaczenie w obronie przeciwnowotworowej pełnią cytokiny profilu Th1: IL-2, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Wywierają one działanie sprzyjające rozwojowi odpowiedzi typu komórkowego, w którym elementami efektorowymi są limfocyty cytotoksyczne CD8+ [45,56,89,90]. Cytokiny uwalniane przez limfocyty Tc1: IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  biorą udział w nasilaniu reakcji komórkowych skierowanych przeciw komórkom nowotworowym (indukcja apoptozy m.in. w mechanizmie FAS-FAS-L, przy udziale perforyn, granzym i kaspaz) [45,56,89,90]. Należy podkreślić, że aktywność skierowana przeciw komórkom nowotworowym wymaga współpracy różnych typów komórek. Limfocyty Th2 przez IL-4, IL-5, IL-6 wspomagają syntezę swoistych przeciwciał przez limfocyty B, natomiast Th1 i Tc1 przez działanie IFN- $\gamma$  aktywują makrofagi, przez IL-2 aktywują komórki NK. Th1 mogą również bezpośrednio zabijać komórki nowotworowe (TNF- $\beta$ ) lub hamować ich proliferację (interferony, TNF- $\beta$ ). Cytokiny spełniają, zatem bardzo ważną rolę w zjawiskach odporności przeciwnowotworowej. Do tej grupy zaliczane są interleukiny (IL), interferony (IFN- $\alpha,\beta$ ), czynniki martwicy nowotworu (TNF- $\alpha,\beta$ ) oraz czynniki wzrostu

(GM-CSF). Znaczenie tych czynników w onkologii klinicznej opiera się na ich własnościach modyfikowania odpowiedzi immunologicznej. W chwili obecnej największe nadzieje budzi terapia skojarzona z zastosowaniem cytokin: IL-2, a także IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, IFN oraz TNF.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABDEL-LATIF MM, O'RIORDAN JM, RAVI N, KELLEHER D, REYNOLDS JV. Activated nuclear factor-kappa B and cytokine profiles in the esophagus parallel tumor regression following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Dis Esophagus* 2005; **18**(4): 246–252.
- [2] ABREU MT, ARNOLD ET, THOMAS LS. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial. *J Biol Chem* 2002; **277** (23): 20431–20436.
- [3] AGGARWAL BB. Apoptosis and nuclear factor –  $\kappa$ B: a tale of association and dissociation. *Biochem Pharmacol* 2000; **60**: 1033–1038.
- [4] AKIRA SJ. *Biol Chem* 2003; **278**: 38105–38110.
- [5] ANDERSON KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 13–18.
- [6] ASHKENZAI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305–1310.
- [7] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 1996; **87**: 13–18.
- [8] BAEUERLE PA, HENKEL T. Function and activation of NF $\kappa$ B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1994; **12**: 141–146.
- [9] BAETZ A, FREY M, HEEG K. Suppressor of Cytokines Signaling (SOCS) Proteins Indirectly Regulate Toll-like Receptors Signaling in Innate Immune Cells. *J Biol Chem* 2004; **279**, 52: 54708–54713.
- [10] BALDWIN Jr AS. The NF $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; **14**: 649–654.
- [11] BARGOU RC, LENG C, KRAPPMANN D. High-level nuclear NF $\kappa$ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Stenberg cells. *Blood* 1996; **87**: 4340–4345.
- [12] BARKETT M, GILMORE TD. Control of apoptosis by Rel/NF $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6910–6915.
- [13] BARTEK J, BARTKOVA J, LUKAS J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res* 1997; **23**: 1–6.
- [14] BEUTLER B. Tlr4: central komponent of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 20–25.
- [15] BISWAS DK, CRUS AP, GANSBERGER E. Epidermal growth factor-induced nuclear factor  $\kappa$ B activation: a major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8542–8547.
- [16] BOLAND MP, FOSTER SJ, O'NEIL LAJ. Danarubicin activates NF $\kappa$ B and induces NF $\kappa$ B-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12952–12957.
- [17] CHAUDHARY PM, EBY MT, JASMIN A. Activation of the NF $\kappa$ B pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* 2000; **19**: 4451–4556.
- [18] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X. New Insights into the role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in Cell Growth Regulation. *Am J Pathol* 2001; **159**: 387–393.
- [19] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X. New Insights into the role of Nuclear Factor- $\kappa$ B a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; **45**: 7–15.
- [20] CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, LANE BR. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 1997; **175**: 1122–1127.
- [21] CHOW JC, YOUNG DT, GOLENBOCK W. Toll-like receptor-4 mediates lipopolisaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; **174**: 10689–10693.
- [22] CHUANG T, ULEVITH RJ. *Eur Cytokine Netw* 2000; **11**: 372–375.
- [23] CLURMAN BE, GROUDINE M. The CDKN2A tumor-suppressor gene – a tale of two proteins. *N Engl J Med* 1998; **338**: 910–915.

- [24] CORDON-CARDO C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; **147**: 545–150.
- [25] COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Robbins Pathologic Basis of Disease. W.B. Saunders Company, wyd. 6, New York: 1998.
- [26] DAHL AM, KLEIN C, ANDRES PG. Expression of Bcl-XL restores cell survival, but not proliferation of effector differentiation, in CD28-deficient T lymphocytes. *J Exp Med* 2000; **191**: 2031–1035.
- [27] DARZYŃKIEWICZ Z, GONG J, JUAN G. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 1996; **25**: 1–7.
- [28] DEPTALA A, BEDNER E, GORCZYCA W. Simple assay of activation of nuclear factor kappa B (NFκB) by laser scanning cytometry (LSC). *Cytometry* 1998; **33**: 376–381.
- [29] DONNELLAN R, CHETTY R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol Mol Patol* 1998; **51**: 1–7.
- [30] GABRIEL A, NAMYSŁOWSKI G, ZIÓŁKOWSKI A, MORAWSKI K, URBANIEC P. Porównanie przydatności stopnia zróżnicowania histologicznego G i zaawansowania nowotworu w froncie guza w przewidywaniu czasu przeżycia i wznowy u chorych z rakiem krtani. *Otolaryngol Pol* 1997; **28**, 51: 188–193.
- [31] GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB. NFκB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Ann Rev Immunol* 1998; **16**: 225–230.
- [32] GILLET CE, BARNES DM. Cell cycle. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1998; **51**: 310–316.
- [33] GILLET CE, MILES DW, RYDER K. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2001; **193**: 433–438.
- [34] GILMORE TD, KOEDOOD M, PIFFAT KA. Rel/NF-κB/IκB proteins and cancer. *Oncogene* 1996; **13**: 1367–1374.
- [35] GREEK DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1315.
- [36] GUROVA KV, HILL JE, GUO C, PROKVOLIT A, BURDELYA LG, SAMOYLOVA E, KHODYAKOVA AV, GANAPATHI R, GANAPATHI M, TARAROVA ND, BOSYKH D, LVOVSKIY D, WEBB TR, STARK GR, GUDKOV AV. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kappaB-dependent mechanism of p53 suppression in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Nov **29**;102(48):17448–17453.
- [37] GUTTRIDE DC, ALBANESE C, REUTHER JY. NFκB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5785–5790.
- [38] HINZ M, KRAPPMANN D, EICHTEN A. NFκB function in growth control: Regulation of Cyclin D1 expression and G0/G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2690–2695.
- [39] HIRAMA T, KOEFLER HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; **86**: 841–846.
- [40] HOCKENBERRY DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci* 1995; **18**: 51–56.
- [41] HOSHINO K, TAKEUHI O, KAWAI T. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; **162**: 3749–3754.
- [42] HSU SC, GAVRILIN MA, LEE HH. NFκB-dependent Fas ligand expression. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 2948–2954.
- [43] HUNTER T, PINES J. Cyclins and cancer. *Cell* 1992; **66**: 441–446.
- [44] HUNTER T. Braking the cycle. *Cell* 1993; **75**: 839–845.
- [45] ITON, NAKAMURA H, TANAKA Y, OHGI S. Analysis of T Helper Type 1 and 2 Cells and T Cytotoxic Type 1 and 2 Cells by Intracellular Cytokine Detection with Flow Cytometry. *Cancer* 1999; **1**, 85, 11: 2359–2364.
- [46] IVANOV VN, LEE RK, PODACK ER. Regulation of Fas-dependent activation induced T cell apoptosis by cAMP signaling: a potential role for transcription factor NFκB. *Oncogene* 1997; **14**: 2455–2460.
- [47] JANEWAY CA, METZHITOV R. Lipoproteins take their toll on the host. *Curr Opin Immunol* 1999; **9**: 879–883.
- [48] JI GZ, WANG XH, MIAO L, LIU Z, ZHANG P, ZHANG FM, YANG JB. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006 Jan **28**;12(4): 644–648.
- [49] JIANG Q, MATSUZAKI Y, LI K, UITTO J. Transcriptional regulation and characterization of the promoter region of the human ABCG6 gene. *J Invest Dermatol* 2006 Feb; **126**(2): 325–335.
- [50] JOYCE D, BOUZAHAH B, FU M. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor κB-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25245–25250.
- [51] JURGENSMEIER JM, XIE Z, DEVERAUX Q. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4997–4983.
- [52] Karin M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Ann Rev Immunol* 2000; **18**: 621–627.
- [53] KASIBHATLA S, BRUNNER T, GENESTIER L. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NFκB and AP-1. *Mol Cell* 1998; **1**: 543–548.

- [54] KAUR S, WANG F, VENKATRAMAN M, ARSURA M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) through ubiquitin-mediated proteosomal degradation of the TGF-beta1-activated kinase 1 (TAK1). *J Biol Chem* 2005 Nov 18; **280**(46): 38599–38608
- [55] KOPP EE. ESCIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 1999; **13**: 2059–2064.
- [56] KOWALSKI M. [red.] Immunologia kliniczna cz. I. Immunologia ogólna. *Mediton* 2002: 1–27.
- [57] KUMAR S. The Bcl-2 family of proteins and activation of the ICE-CES-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis? *Cell Death Diff* 1997; **4**: 2–7.
- [58] KUWANA T, SMITH JJ, MUZIO M. Apoptosis induction by caspase-8 in amplified through mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 1998; **273**: 1689–1693.
- [59] LaCASSE EC, BAIRD S, KORNELUK RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; **17**: 3247–3252.
- [60] LATINIS KM, NORIAN LA, ELIASON SL. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31427–31435.
- [61] LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; **371**: 346–351.
- [62] LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323–328.
- [63] LI X, GONG Z, LI H. Study on Toll-like receptors expression and cytokines production induced by bacillus Calmette-Guerin in human bladder cancer cell. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2004; **42** (3): 177–183.
- [64] LIU L, KWAK YT, BEX F. DNA-dependent protein kinase phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  regulates NF $\kappa$ B DNA binding properties. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4221–4229.
- [65] LUNDBERG AS, WEINBERG RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; **35**: 531–536.
- [66] MARZO I, SUSIN SA, PETIT PX. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett* 1998; **427**: 198–193.
- [67] MATSUGUHI T, TAKAGI K, MUSIKACHAROEN J. *Blood* 2000; **95**: 1378–1383.
- [68] HSU SC, GAVRILIN MA, LEE HH. NF $\kappa$ B-dependent Fas ligand expression. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 2948–2954.
- [69] MENZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adoptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394–397.
- [70] MUKHOPADHYAY T, ROTH JA, MAXWELL SA. Altered expression of the p50 subunit of the NF $\kappa$ B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1995; **11**: 999–1004.
- [71] MUZIO M, BOSISIO D, POLENTARUTTI N. Differential Expression and Regulation of Toll-like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cell. *J Immunol* 2000; **164**: 5998–5993.
- [72] MUZIO M, POLENTARUTTI N, BOSISIO D. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 450–455.
- [73] NAKAYAMA H, IKEBE T, SHIRASUNA K. Effects of I $\kappa$ B kinase alpha on the differentiation of squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2005 Aug; **41**(7): 729–737.
- [74] NINOMIYA-TSUJI J. The kinase TAK1 can activate the NIK-I $\kappa$ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999; **398**: 252–257.
- [75] NISHIMURA M, NAITO S. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-like Receptors and Related Genes. *Biol Pharm Bull* 2005; **28** (5): 886–871.
- [76] ONDREY NG, DONG G, SUNWOO J. Constitutive Activation of Transcription Factors NF $\kappa$ B, AP-1 and NF-IL6 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines that Express Pro-inflammatory Pro-, angiogenic Cytokines. *Molecular Carcinogenesis* 1999; **26**: 119–126.
- [77] O'NEIL LA, GREENE C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in the mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 650–655.
- [78] PAHL HL. Activators and target genes of Rel/NF $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6853–6858.
- [79] PALLARES J, MARTINEZ-GUITARTE JL, DOLCET X, LLOBET D, RUE M, PALACIOS J, PRAT J, MATIAS-GUIU X. Abnormalities in the NF- $\kappa$ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004 Dec; **204**(5): 569–577.
- [80] PALOMBELLA VJ, RANDO OJ, GOLDBERG AL. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF $\kappa$ B1 precursore protein and the activation of NF $\kappa$ B. *Cell* 1994; **78**: 773–778.
- [81] PERKINS N.D, FELZIEN LK, BETTS JC. Regulation of NF $\kappa$ B by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 1997; **275**: 523–528.

- [82] POLTRAK A, HE X, SMIRNOVA I. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in the Tlr4 gene. *Science* 1998; **282**: 2085–2090.
- [83] QIAO L, ZHANG H, YU J, FRANCISCO R, DENT P, EBERT MP, ROCKEN C, FARRELL G. Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role. *Hum Gene Ther* 2006 Mar; **17**(3): 280–290.
- [84] REED JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; **17**: 3225–3229.
- [85] REED JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; **124**: 1–7.
- [86] RIVERA-WALSH I, CVIJK ME, XIAO G. The NFkB signaling pathway is not required for Fas ligand gene induction but mediates protection from activation-induced cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25222–25228.
- [87] RODRIGUEZ-PINILLA M, RODRIGUEZ-PERALTO JL, HITT R, SANCHEZ JJ, SANCHEZ-VERDE L, ALAMEDA F, BALLESTIN C, SANCHEZ-CESPEDES M. Beta-Catenin, NF-kappaB and FAS protein expression are independent events in head and neck cancer: study of their association with clinical parameters. *Cancer Lett* 2005 Dec 8; **230**(1): 141–148.
- [88] RYAN KM, ERNST MK, RICE NR. Role of NFkB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 2000; **404**: 892–896.
- [89] SHEU B, HSU S, HO H, LIN R. Reversed CD4/CD8 Ratios of Tumor-Infiltrating Lymphocytes are Correlated with the Progression of Human Cervical Carcinoma. *Cancer* 1999; **86**, 8: 1537–1542.
- [90] SHEU B, LIN R, LIEN H, HO H. Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Cervical Cancer. *J Immunol* 2001; **167**: 2972–2976.
- [91] SHERR CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; **73**: 1059–1063.
- [92] SIEBENLIST U, FRANZOSO G, BROWN K. Structure, regulation and function of NF-kB. *Ann Rev Cell Biol* 1994; **10**: 405–410.
- [93] SOVAK MA, BELLAS RE, KIM DW. Aberrant nuclear factor kB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2952–2957.
- [94] SUN J, WIKLUND F, ZHENG SL. Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *J Nat Cancer Inst* 2005; **6**, 97 (7): 525–530.
- [95] TAKAESU G. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1, MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 2000; **5**: 649–653.
- [96] TAKEUCHI O, SATO S, HORIUCHI T. *Hemin Immunol* 2004; **16**: 3–9.
- [97] TAKEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; **11**: 443–449.
- [98] UNDERHILL DM, OZINSKY A, HAJJAR A. The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; **401**: 811–815.
- [99] VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSH M. Identification of Diablo, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; **102**: 43–47.
- [100] WADGAONKAR R, PHELPS KM, HAQUE Z. CREB-binding protein is nuclear integrator of nuclear factor kB and p53 signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1879–1883.
- [101] WANG CY, MAYO MW, KORNELUK RG. NFkB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and cIAP1 and cIAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680–1685.
- [102] WADGAONKAR R, PHELPS KM, HAQUE Z. CREB-binding protein is nuclear integrator of nuclear factor kB and p53 signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1879–1883.
- [103] WOLTER KG, HSU YT, SMITH CL. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1281–1286.
- [104] WYLELI AH, ARENDS MJ, MORRIS RG. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Seminars Immunol* 1992; **4**: 389–393.
- [105] ZHANG G, GHOSH S. Toll-like receptor-mediated NF-kB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001; **107**, 1: 13–17.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 22.02.2006 r.*

*Przyjęto: 06.08.2006 r.*

*ul. Wandurskiego 3a m.22, 93-218 Łódź*

*email: katarzyna.starska@op.pl*



## UDZIAŁ BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH POWTÓRZENIA BOGATE W LEUCYNĘ (LRR) W MOLEKULARNYCH MECHANIZMACH ODPORNOŚCI WRODZONEJ ROŚLIN I ZWIERZĄT\*

INVOLVEMENT OF LEUCINE RICH REPEATS (LRR) DOMAIN CONTAINING PROTEINS IN MOLECULAR MECHANISMS OF INNATE IMMUNITY OF PLANTS AND ANIMALS

Zbysław SOŃDKA<sup>1</sup>, Andrzej TRETYN<sup>1</sup>, Jacek SZELIGA<sup>2</sup>, Marek JACKOWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej oraz

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologii i Onkologii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Streszczenie:* Mechanizmy odporności nieswoistej są pierwszą, a u większości organizmów jedyną linią obrony przeciw patogennym drobnoustrojom. Działanie tych mechanizmów zaczyna się od rozpoznania charakterystycznego wzoru molekularnego związanego z patogenem (PAMP) przez białka zawierające powtórzenia bogate w leucynę (LRR). Roślinne białka „R” zbudowane są z domen TIR, NBD oraz LRR i specyficznie rozpoznają patogeny pochodzenia grzybowego, bakteryjnego, jak i wirusowego. Po rozpoznaniu obecności patogena zapoczątkowują one kaskadę sygnałową, w większości przypadków prowadzącą do wywołania reakcji nadwrażliwości w rejonie infekcji. Najlepiej dotąd poznanymi zwierzęcymi białkami rozpoznającymi PAMP są receptory Toll-podobne. Podczas infekcji przy pomocy zewnątrzkomórkowej domeny LRR wiąże one cząsteczki patogena. Oddziaływanie te prowadzą do wystąpienia reakcji immunologicznej: produkcji chemokin, cytokin, regulatorów transkrypcji, translacji i procesów proteolitycznych oraz białek sekrecyjnych, takich jak składniki układu dopełniacza. Białka z rodziny NOD to ostatnio odkryte wewnątrzkomórkowe receptory PAMP. Pod względem struktury przypominają one roślinne białka „R”. Ich funkcja polega na rozpoznawaniu składników bakteryjnych ścian komórkowych i uruchamianiu reakcji zapalnych poprzez aktywację czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B. Wykazano, że obecność mutacji w białku NOD2 ma związek z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna, młodzieńczej sarkoidozy, syndromu Blau’a oraz pewnych typów nowotworów.

*Słowa kluczowe:* odporność nieswoista, wzory cząsteczkowe związane z patogenami, PAMP, domena LRR, receptory Toll-podobne, NOD, CARD.

\*Praca powstała podczas realizacji grantu pomostowego (552 CM/B) Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

*Summary:* Innate immunity is the first and in most organisms sole line of defence against pathogenic microorganisms. The activity of mechanisms of innate immunity starts with recognition of pathogen-associated molecular pattern (PAMP) by proteins that contain leucine rich repeats (LRR) domain. Plant proteins 'R' contain TIR, NBD and LRR domains and recognize specifically fungal, bacterial or viral pathogens. After pathogen detection signal cascade is initiated that results in most cases with hypersensitive reaction in region of infection. In animals Toll-like receptors are best described PAMP-recognizing molecules to date. With its extracellular LRR domain they can bind pathogen-derived molecules but also molecules that are produced by host organism during infection. Such interaction leads to immune reaction: production of chemokins, cytokines, regulators of transcription, translation and proteolytic processes or synthesis of secretional proteins including these belonging to complement system. NOD proteins are recently discovered mammalian intracellular PAMP receptors that resembles plant 'R' proteins by its domain structure. They recognize components of bacterial cell wall and trigger inflammatory reaction by activation of nuclear factor (NF- $\kappa$ B). Mutations in NOD protein NOD2 has been found to be related to Crohn disease, early onset sarcoidosis, Blau syndrom and certain types of cancer.

*Key words:* innate immunity, pathogen-associated molecular pattern, PAMP, LRR domain, Toll-like receptors, NOD, CARD.

## WSTĘP

Historia patogennych mikroorganizmów pasożytujących na organizmach wyższych jest równie długa jak historia istnienia samych wielokomórkowców. Zarówno u roślin [77], jak i u zwierząt [52] stwierdzono występowanie złożonych systemów mających za zadanie ochronę przed patogenami. Systemy te wyewoluowały pod wpływem wzajemnego oddziaływania patogena i atakowanego przez niego organizmu, co skutkowało lepszym rozprzestrzenianiem się patogenów wykształcających nowe cechy pozwalające pokonać bariery odpornościowe gospodarza. Z drugiej strony wśród gospodarzy większe szanse na przekazanie swych genów potomstwu miały osobniki wyposażone w doskonalszy układ odpornościowy [58].

W związku z odmiennymi strategiami życia roślin i zwierząt, różna jest specyfika atakujących je pasożytów oraz strategii i mechanizmów obrony przed nimi. Zwierzęta mają zdolność ruchu, zatem mogą sobie przekazywać patogeny. Mają także mniej lub bardziej rozwinięty układ krążenia z wyspecjalizowanymi w obronie komórkami żemnymi oraz komórkami produkującymi przeciwciała [52]. Rośliny prowadzą osiadły tryb życia, co wymusza na ich pasożytach zdolność do poruszania się lub korzystania z wektorów zwierzęcych umożliwiających ich przeniesienie na gospodarza. U roślin, w trakcie ich ewolucji, nie wykształcony został układu krążenia. Jednocześnie nie mają one krytycznych organów, których uszkodzenie prowadzić mogłoby do śmierci całego organizmu. Dlatego najczęstszą odpowiedzią rośliny na infekcję jest reakcja nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*; HR), w wyniku której komórki w miejscu zaatakowanym obumierają, zanim patogen zdąży rozprzestrzenić się poza miejsce ataku [77].

## 1. UKŁAD ODPORNOŚCI WRODZONEJ

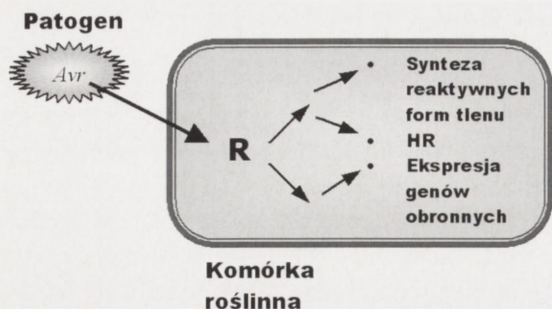
U zwierząt i człowieka wyróżnia się odporność nabytą i wrodzoną. Ta pierwsza wykształca się w czasie życia osobniczego pod wpływem kontaktów z patogenami. Funkcjonującą również u roślin odporność wrodzoną tworzy system mechanizmów obronnych, działających niezmiennie od początku życia obu grup organizmów. System odporności wrodzonej jest ewolucyjnie bardzo stary. Jego składniki zostały odnalezione u większości organizmów, a receptory do niego należące charakteryzują się bardzo zbliżoną budową u roślin, zwierząt bezkręgowych oraz kręgowców, w tym również u człowieka [17, 32, 60, 67].

W odróżnieniu od receptorów układu odporności nabytej, które bardzo specyficznie rozpoznają konkretne epitopy odpowiedniego antygeny, receptory należące do układu odporności wrodzonej rozpoznają konserwatywne motywy charakterystyczne dla całej grupy patogenów: lipopolisacharydy (LPS), peptydoglikany (PGN), bakteryjne sekwencje CpG DNA i inne, zwane ogólnie wzorami cząsteczkowymi związanymi z patogenem (ang. *pathogen-associated molecular patterns*; PAMP). W związku z tym reakcje organizmu wywołane przez aktywację systemu odporności wrodzonej są niespecyficzne. U zwierząt wykrycie obecności patogena przez receptory układu odporności wrodzonej prowadzi do zwiększonej produkcji cytokin, a zwłaszcza interferonów (IFN), czynników martwicy nowotworów (TNF), interleukin (IL) oraz chemokin. Do reakcji systemu odporności wrodzonej zalicza się także uśmiercanie zainfekowanych lub uległych transformacji nowotworowej komórek przez limfocyty NK, makrofagi, komórki dendrytyczne i układ dopełniacza w sposób niezależny od głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*; MHC) [52].

## 2. BIAŁKA R – KLUCZOWY ELEMENT SYSTEMU ODPORNOŚCI WRODZONEJ ROŚLIN

W latach 40. XX wieku, stosując metody genetyki klasycznej Flor opracował model „gen na gen”, opisujący mechanizm działania odporności wrodzonej roślin [30]. Odkrył, że do wystąpienia odpowiedzi na atak patogena konieczne jest współdziałanie produktu roślinnego genu, określonego jako gen odporności (ang. *resistance*; *R*) oraz pochodzącego od patogena czynnika (elicitora), będącego produktem genu awirulencji (ang. *avirulence*; *Avr*). Oba rodzaje genów dziedziczne są jako dominujące.

Patogen atakujący roślinę jest rozpoznawany przy udziale roślinnych genów odporności (*R*), które aktywują się pod wpływem obecności odpowiadających im genów awirulencji (*Avr*), ulegających ekspresji w komórkach patogena (ryc. 1). Odpowiedź protekcyjna rośliny następuje tylko w przypadku jednoczesnego występowania odpowiedniego genu *Avr* u patogena i specyficznego dla niego genu *R* u rośliny. W innym przypadku odpowiedzi nie ma i choroba może się rozwijać [77, 84]. Tak więc



RYCINA 1. Model „gen na gen”. W modelu „gen na gen” wyróżnia się cztery etapy reakcji komórki roślinnej na atak patogena: dostarczenie cząsteczki elicitora do komórki roślinnej; rozpoznanie elicitora przez komórkę roślinną przy udziale białka R, przekazanie sygnału, aktywacja mechanizmów obronnych (na podstawie [84], zmodyfikowane)

ten rodzaj odporności opiera się na informacji wpisanej w genom rośliny, na podstawie której tworzy ona ściśle wyspecjalizowane cząsteczki białka, wykrywające konkretny gatunek patogena.

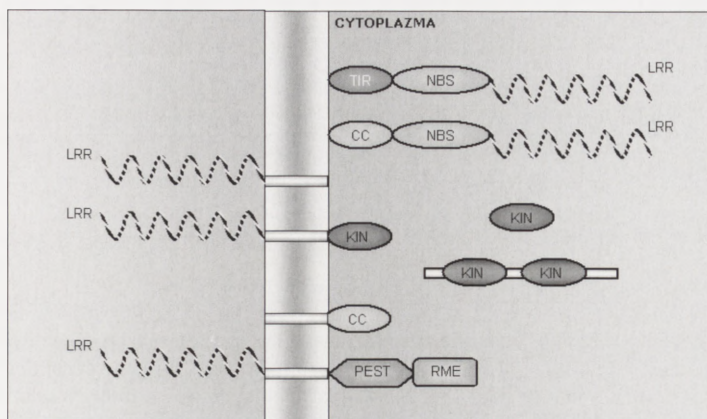
Jak dotąd opisano zaledwie jeden przypadek bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkiem R i czynnikiem wirulencji. Występujące u ryżu białko Pita, poprzez swoją domenę LRR (patrz poniżej) łączy się z białkiem Avr-Pita, pochodzącym od pasożytującego na ryżu grzyba *Magnaporthe grisea*, wywołując reakcję odpornościową [53]. W wielu innych badanych układach nie udało się jednak potwierdzić takiego oddziaływania [62].

Obecnie coraz więcej dowodów przemawia za tzw. teorią strażnika, w której białka R nie rozpoznają produktów genów *Avr* bezpośrednio, lecz są częścią większego kompleksu. Czynniki *Avr* są wprowadzane do wnętrza komórki, by zaatakować pewne krytyczne punkty systemu metabolicznego komórki i umożliwić inwazję patogena. Białka R działają jako strażnik, pilnujący prawidłowego działania potencjalnie atakowanego punktu. Wykrywa przyłączenie czynnika wirulencji do cząsteczki docelowej, uruchamiając reakcję odpornościową [28].

W ostatnich latach odkryto naturę produktów genów *R*. Białka kodowane przez te geny sklasyfikowano w pięciu rodzinach [28]. Największa z nich obejmuje polipeptydy mające miejsce wiązania nukleotydu (ang. *nucleotide binding site*; NBS) oraz domeny zawierające powtórzenia bogate w leucynę (ang. *nucleotide binding site and leucine-rich repeat domains*; NBS-LRR proteins) (ryc. 2). W komórce białka te występują w cytoplazmie, prawdopodobnie w bliskim sąsiedztwie błony komórkowej i mogą odpowiadać pośrednio lub bezpośrednio za wykrycie obecności patogena [20]. Zsekwencjonowanie genomu *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnika pospolitego) pozwoliło na identyfikację wszystkich 149 genów należących do rodziny NBS-LRR [67].

Stosując metody genetyki klasycznej wykazano, że wiele genów *R* ułożonych jest w genomie pakietowo [47]. Komputerowe analizy zsekwencjonowanych genomów roślinnych potwierdziły te odkrycia u *Arabidopsis* i ryżu [11, 66, 73].

Około 2/3 genów NBS-LRR (109 ze 149) u *Arabidopsis* jest ułożonych w 43 grupy. Największa z nich (*RPP4/RPP5*) znajduje się na chromosomie 4 i zawiera sekwencje nukleotydowe kodujące 7 różnych białek NBS-LRR [67].



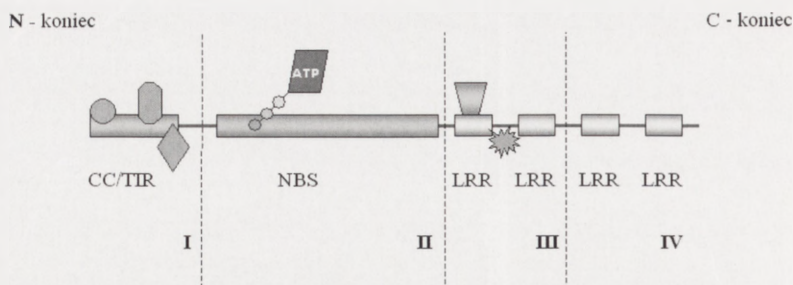
RYCINA 2. Rodzaje białek R. Większość białek R zawiera powtórzenia bogate w leucynę (LRR), odpowiedzialne za specyficzność rozpoznawania patogena. Największą grupę wśród białek R tworzą białka NBS-LRR, zawierające na N-końcu domenę TIR lub CC. Rodzina eLRR to białka z zewnątrzkomórkową domeną LRR połączoną z domeną transbłonową. Po stronie cytoplazmatycznej plazmolemy, może być do nich dołączona domena o aktywności kinazy serynowo-treoninowej (KIN). Białko RPW8 z *Arabidopsis* składa się jedynie z domeny transbłonowej oraz przypuszczalnej domeny CC. Odkryte u pomidora białko Ve2 zawiera zewnątrzkomórkową domenę LRR, natomiast po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej ma domenę PEST odpowiedzialną za degradację białek oraz krótkie motywy mające związek z zależną od receptora endocytozą (RME) (na podstawie [54], zmodyfikowane)

W obrębie grupy białek NBS-LRR można wyróżnić dwa podtypy charakteryzujące się występowaniem bądź brakiem regionu homologicznego do domeny TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) w rejonie N-końcowym (ryc. 3). TIR jest wysoce konserwatywnym motywem, zidentyfikowanym pierwotnie u owadów, a następnie u ssaków, który podobnie jak u roślin bierze udział w procesach odpowiedzi wrodzonej na atak patogenów [21, 65, 66].

Większość białek pozbawionych domeny TIR ma N-końcowy motyw CC (ang. *coiled coil*), który zlokalizowany jest w odległości 25 do 50 reszt aminokwasowych (aa) od N-końca. Białka te tworzą podgrupę białek NBS-LRR nazwaną CNL (CC-NBS-LRR). Nie stwierdzono przypadku, aby motywy CC oraz TIR występowały obok siebie w obrębie tego samego polipeptydu [65, 67].

Występowanie miejsc wiązania nukleotydu (NBS) stwierdzono u wielu różnych białek. Ich funkcja polega na wiązaniu ATP lub GTP [75, 86]. Zdolność roślinnych białek NBS-LRR do wiązania nukleotydów (ATP, dATP, ADP, dADP), jak również ich hydrolizy została wykazana dla białek I2 oraz Mi pomidora [78].

Na swym C-końcu białka NBS-LRR mają region o zmiennej długości, zbudowany z różnej liczby powtórzeń bogatych w reszty leucynowe (LRR) [15, 16, 21, 37]. Powtórzenia te występują w liczbie od 8 do 25 (najczęściej 14) [67]. Wykazano, że oprócz wiązania różnego typu ligandów domeny LRR mogą brać udział w tworzeniu oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych, odpowiedzialnych za modulację sygnału [48].



RYCINA 3. Budowa białek NBS-LRR: I – miejsce oddziaływania z przekaźnikami sygnału *downstream*, II – miejsce przyłączenia i hydrolizy ATP lub GTP z dostarczeniem energii koniecznej dla uwolnienia sygnału, III – miejsce przyłączenia czynników modulujących sygnał, IV – miejsce oddziaływania z aktywatorem *upstream* (na podstawie [67], zmodyfikowane)

### 3. ZWIERZĘCE RECEPTORY UKŁADU ODPORNOŚCI WRODZONEJ

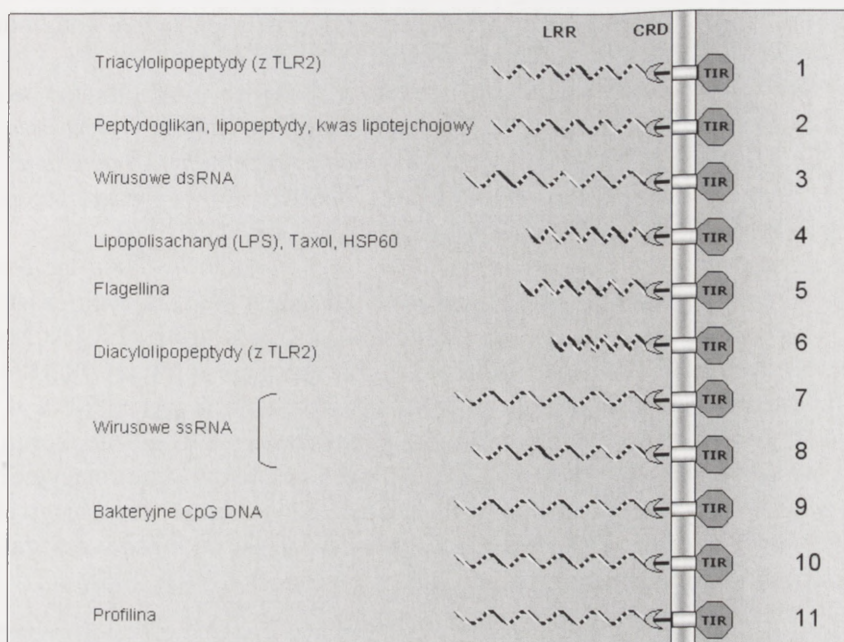
#### 3.1. Budowa i działanie TLR

Najważniejsze ze zwierzęcych receptorów wchodzących w skład układu odporności wrodzonej należą do rodziny znanej jako TLR (ang. *Toll-Like Receptors*). Gen *toll* został odkryty w roku 1980 w genomie *Drosophila melanogaster* przez Nusslein-Volhard i Wieschausa. Zidentyfikowano go jako gen odpowiedzialny za zróżnicowanie grzbietowo-brzusze w rozwoju muszki owocowej i nazwano *toll*, co w języku niemieckim oznacza „światny, klawy” [69]. W 1995 r. za badania te wyżej wymienieni naukowcy zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Później okazało się także, że ten sam gen u dorosłych osobników muszki owocowej jest odpowiedzialny za odporność na infekcje grzybowe [60].

Podobne geny oraz ich produkty zostały odnalezione także u innych organizmów – zarówno bezkręgowców, jak i kręgowców, a także u roślin [17, 39, 67].

Białka kodowane przez geny podobne do *toll* określane są mianem TLR. U człowieka motyw identyczny z TLR odkryto w receptorze interleukiny 1, gdzie stanowi on cytozoolową domenę białka. TLR uważane są obecnie za najważniejsze cząsteczki rozpoznające PAMP, znajdujące się po zewnętrznej stronie błony komórkowej [32].

Do tej pory u człowieka odkryto 11 różnych typów TLR. Każdy z nich odpowiada za rozpoznanie specyficznej grupy cząsteczek charakterystycznych dla patogena (ryc. 4). Wykazano także, że TLR zdolne są także do rozpoznawania pewnych cząsteczek endogennych. Obserwacje te są zgodne z założeniami modelu zagrożenia (ang. *danger model*), według której do aktywacji odpowiedzi immunologicznej dochodzi nie tylko poprzez działanie ligandów pochodzących od patogena, ale też poprzez działanie endogennych cząsteczek, tzw. sygnałów zagrożenia, uwalnianych przez ginące lub martwe komórki [63]. Do endogennych ligandów TLR należą: białka szoku cieplnego, białko A surfaktantu płucnego i kwas hialuronowy [35, 80, 83].



RYCINA 4. Receptory TLR oraz ich ligandy. Objasnienia: LRR – reszty bogate w leucynę; CRD – domena bogata w cysteinę (na podstawie [82], zmodyfikowane)

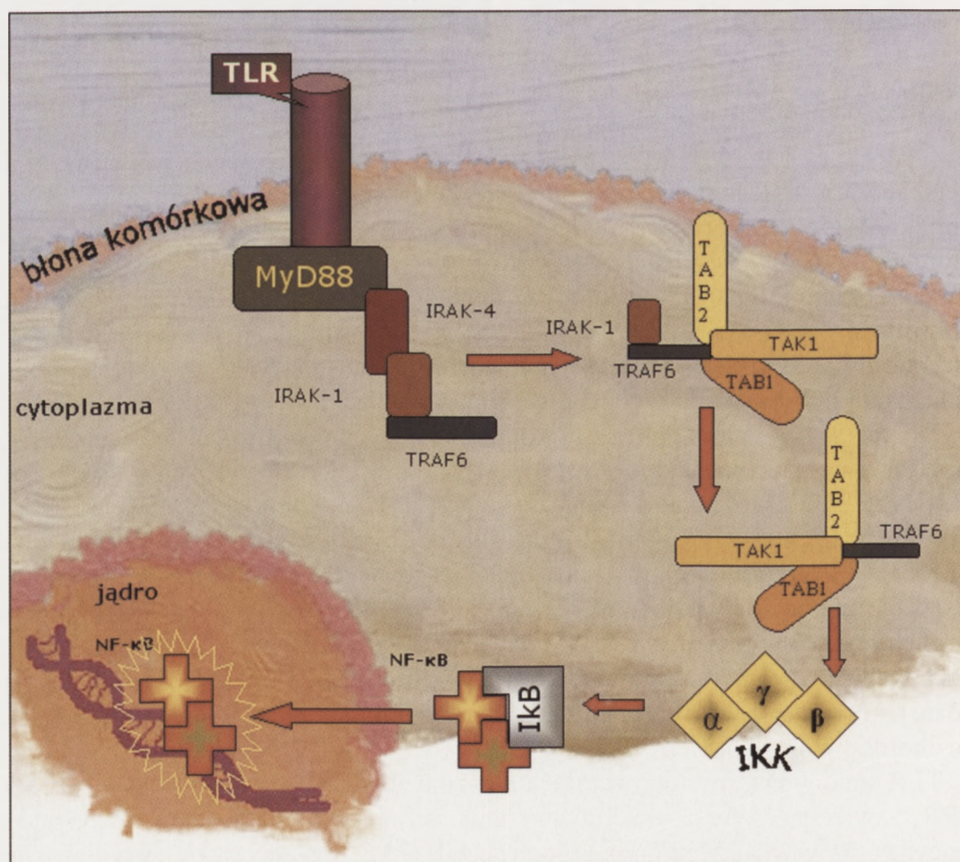
Receptory TLR są zlokalizowane na powierzchni niektórych komórek układu immuno-logicznego oraz na powierzchni innych typów komórek w rejonach ciała, które w naturalnych warunkach pozostają sterylne [7]. Niższą ekspresją TLR charakteryzują się natomiast komórki nabłonka, w miejscach stałego kontaktu z mikroflorą, np. w świetle jelita [1]. Sposobem na uniknięcie stałego pobudzenia receptorów TLR przez bakterie jest odpowiednie ich umiejscowienie w obrębie komórki lub tkanki. Wykrywa-jący obecność bakteryjnej flagelliny TLR5 jest zlokalizowany wyłącznie w bazolateralnej części komórek nabłonka jelit, co powoduje, że jego aktywacja zachodzi dopiero po translokacji flagelliny przez warstwę komórek nabłonka [33]. Podobnie TLR4 ulega ekspresji w komórkach nabłonkowych krypt jelita, gdzie bakterie występują w o wiele mniejszych ilościach niż ma to miejsce w świetle jelita. TLR4 nie jest jednak w tym przypadku białkiem powierzchniowym, ale umiejscowiony jest w błonie aparatu Golgiego. Wykazano, że LPS jest transportowany przez komórki do tych organelli, gdzie następuje aktywacja TLR4 i inicjacja odpowiedzi zapalnej [43]. Wewnątrz-komórkowa lokalizacja TLR4 została odkryta także w nabłonku płuc, gdzie receptor ten pełni kluczową rolę w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej na chorobotwórcze bakterie Gram-ujemne [36].

TLR ssaków są transbłonowymi białkami mającymi zewnątrzkomórkową domenę LRR, zawierającą wielokrotnie powtórzenia sekwencji aminokwasowych bogate w leucynę oraz wewnątrzkomórkową domenę TIR (*Toll-IL-1-Receptor*), która oddziałuje

z białkami rozpoczynając kaskadę sygnałową, kończącą się w jądrze komórkowym uruchomieniem ekspresji czynników obronnych [2].

Wynikiem przyłączenia ligandu do receptora TLR jest uruchomienie kaskady sygnałowej z udziałem takich białek, jak: MyD88, kinaza IRAK (ang. *IL-1RI-associated protein kinases*), kinaza TAK1 (ang. *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase*), białko wiążące kinazę TAK1 – TAB1 i TAB2 oraz czynnik związany z receptorem TNF – TRAF6 (ryc. 5).

Pobudzenie receptora TLR sprawia, że cząsteczka adaptorowa przyłącza się do kompleksu receptorowego, co inicjuje proces dołączania się kolejnych cząsteczek. Pierwszą zidentyfikowaną cząsteczką adaptorową dla receptorów TLR jest MyD88. Do niej, po związaniu się z receptorem TLR, przyłączają się kinazy IRAK-1 oraz IRAK-4. W trakcie formowania tego kompleksu dochodzi do aktywacji IRAK-4, która fosforyluje IRAK-1, co z kolei indukuje przyłączenie TRAF6 do kompleksu receptorowego. Dołączenie czynnika TRAF6 powoduje zmiany konformacyjne białek tworzących kompleks receptorowy, prowadzące do oddysocjowania od niego heterotrimeru IRAK-4/IRAK-1/ TRAF6. Białka te przyłączają się do innego, związanego z błoną komórkową kompleksu, w skład którego wchodzi TAK1, TAB1 i TAB2. W



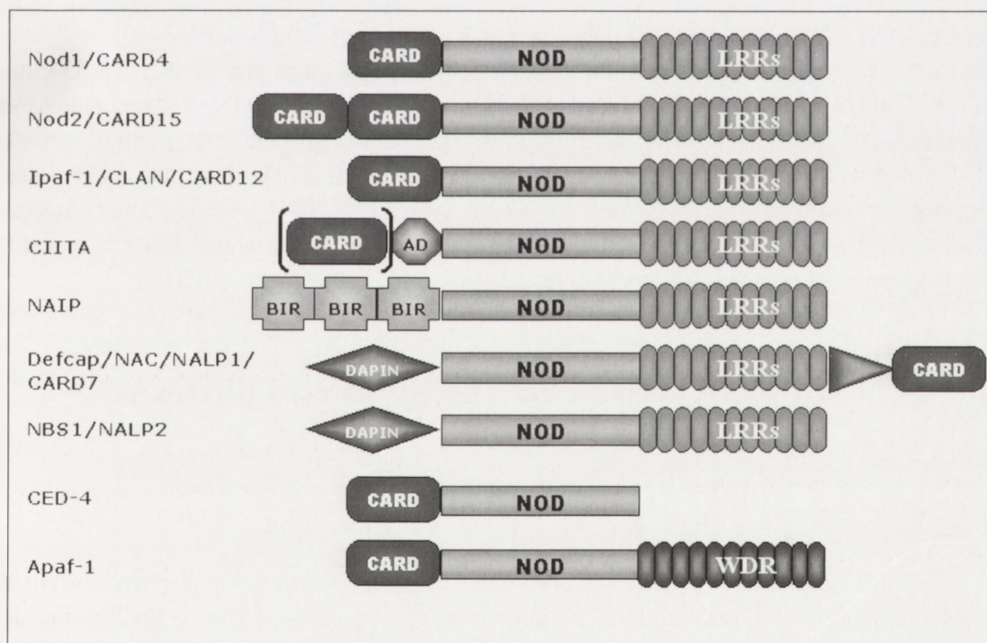
RYCINA 5. Szlak sygnałowy zależny od TLR, opis w tekście (na podstawie [4], zmodyfikowane)



efekcie tego zachodzi fosforylacja TAB2 i TAK1 oraz ich translokacja wraz z TAB1 i TRAF6 do cytozolu. Tam w wyniku kolejnej aktywacji TAK1 dochodzi do oddziaływania z kompleksem kinazy I $\epsilon$ B, co prowadzi do aktywacji czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B i indukcji transkrypcji genów kodujących chemokiny, regulatory transkrypcji, translacji i procesów proteolitycznych oraz białka sekrecyjne, takie jak składniki układu dopełniacza [4, 81]. Ponadto aktywacja TAK1 w obrębie cytoplazmy powoduje aktywację kinaz MAP i JNK [3, 13].

### 3.2. Białka NOD i ich rola w mechanizmach odporności wrodzonej

Jak wspomniano wcześniej, lokalizacja zewnątrzkomórkowych receptorów TLR ogranicza się głównie do sterylnych rejonów ciała, natomiast w miejscach stałego kontaktu z bakteriami receptorów tych brak. Występują natomiast w niektórych tkankach wewnątrzkomórkowe odmiany TLR, dzięki czemu alarm ma miejsce dopiero po pokonaniu przez ligand bariery nabłonka. Niedawno u ssaków wykryto rodzinę genów *NOD* (ryc. 6), kodujących peptydy przypominające roślinne białka R. Białka NOD należą do rodziny cytoplazmatycznych białek CATERPILLER (*CARD*, *Transcription*



RYCINA 6. Białka z rodziny NOD i domeny wchodzące w ich skład. Domena CARD białka CIITA ujęta w nawias występuje w izoformie tego peptydu ulegającej ekspresji w komórkach dendrytycznych. W pobliżu C-końca białka CARD7 umiejscowiona jest niekompletna domena DAPIN. Objasnienia: **AD** – *Activation Domain*; **BIR** – *Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat*; **CARD** – *Caspase Recruitment Domain*; **DAPIN** – *Domain in APoptosis and INterferon response*; **LRRs** – *Leucine Rich Repeats*; **NOD** – *Nucleotide binding Oligomerisation Domain*; **WDR** – *WD40 Repeats* (na podstawie [51], zmodyfikowane)

*Enhancer, R(purine)-binding, Pyrin, Lots of Leucine Repeats*), uczestniczących w procesach regulacji apoptozy i odpowiedzi zapalnej. U człowieka w skład rodziny CATERPILLER wchodzi około dwudziestu różnych białek, charakteryzujących się podobnym układem domen [38]. N-końcową część tych białek tworzy zwykle domena PYD lub CARD, której zadaniem jest przekazywanie sygnału cząsteczce efektorowej. Centralną część białka zajmuje domena NACHT/NOD wraz z towarzyszącymi jej domenami NAD (*NACHT-Associated Domains*), odpowiadająca za zdolność do oligomeryzacji białek, a także wiązania trifosfonukleotydów. W części C-końcowej znajdują się powtórzenia bogate w leucynę, dzięki którym następuje rozpoznanie ligandu.

Podobnie jak białka R, a w odróżnieniu od TLR białka z rodziny NOD nie mają domen transbłonowych ani zewnątrzkomórkowych i umiejscowione są w cytozolu. Dwa z nich – NOD1 i NOD2 pełnią rolę cytoplazmatycznych receptorów, składników bakteryjnej ściany komórkowej oraz inicjatorów szlaku sygnałowego prowadzącego do reakcji zapalnej [51].

*NOD1* oraz *NOD2* znaleziono w genomowych bazach danych przeszukiwanych pod kątem występowania białek o strukturalnej homologii do Apaf-1, jednego z kluczowych białek zaangażowanych w inicjację procesu programowanej śmierci komórki (tzw. apoptozy). Wykazano, że *NOD1* ulega ekspresji w makrofagach oraz komórkach nabłonka, a także w nabłonku wyścielającym światło jelita [49].

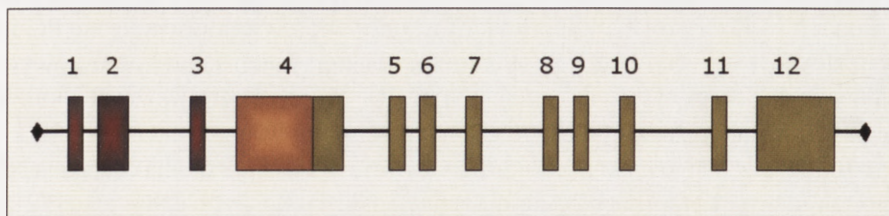
Ligandem specyficznym rozpoznawanym przez Nod1 jest kwas MurNAc-L-Ala-D-Glu-mezo-diaminopimelinowy (M-Tri<sub>DAP</sub>), składnik peptydoglikanu (PGN) występującego w ścianach komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Dzięki temu białko to pełni kluczową rolę w rozpoznawaniu obecności tego typu bakterii przez komórki nabłonka oraz w aktywacji odpowiedzi zapalnej poprzez czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B [34]. Obecnie coraz większą uwagę skupia na sobie białko NOD2, którego nieprawidłowe działanie kojarzone jest z występowaniem wielu poważnych schorzeń, włączając w to nowotwory [61].

## 4. CHARAKTERYSTYKA GENU *NOD2* I BIAŁKA, KTÓRE KODUJE

### 4.1. Odkrycie i budowa genu *NOD2*

W 1996 roku Hugot i wsp. przeprowadzili przeszukiwanie genomów rodzin z występującymi licznymi przypadkami choroby Leśniowskiego-Crohna. Posługując się analizą sprzężeń [68], zidentyfikowali przypuszczalny *locus* związany z podatnością na chorobę. Stwierdzili, że występuje on na chromosomie 16. Genowi, który się tam znajdował, nadali nazwę *IBD1* [46].

Związek choroby Leśniowskiego-Crohna z *locus IBD1* został potwierdzony przez kilka innych ośrodków, w tym przez IBD (*International Genetics Consortium*) [22]. W maju 2001 r. dwa zespoły badawcze niezależnie odkryły pierwszy gen związany z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna – *NOD2* [45, 70]. Stwierdzono, że gen ten składa się z 12 egzonów (ryc. 7 i 8) i koduje białko o długości 1040 aa i masie



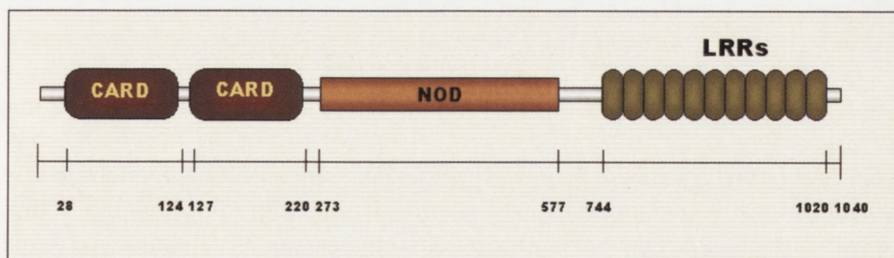
RYCINA 7. Budowa genu *NOD2*. Gen składa się z 12 egzonów oznaczonych cyframi. Domeny białka kodowane przez poszczególne egzony wyróżniono kolorami: ciemnoczerwonym – CARD, pomarańczowym – NOD, zielonym – LRR

115 kDa. Wykazano również, że polipeptyd kodowany przez *NOD2* jest wewnątrzkomórkowym receptorem, częścią systemu odporności wrodzonej. Bierze on udział w rozpoznawaniu składników ściany komórkowej bakterii i wywoływaniu reakcji obronnej przeciw tym bakteriom poprzez czynnik jądrowy  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) aktywujący transkrypcję cytokin prozapalnych, cząstek adhezyjnych, a także cząstek MHC (głównego układu zgodności tkankowej) klasy II [26, 76].

#### 4. 2. Komórkowy i tkankowy wzorzec ekspresji *NOD2*

Początkowo ustalono, że *NOD2* ulega ekspresji jedynie w monocytach [71]. Później wykazano również, że wysoka ekspresja tego genu zachodzi również w komórkach Panetha [59]. Odkryte w 1888 r. przez Josepha Panetha komórki (nazwane później jego nazwiskiem) stanowią część nabłonka jelita. Występują głównie w kryptach jelita cienkiego w pobliżu komórek macierzystych nabłonka [31]. Syntetyzują one substancje antybakteryjne i gromadzą je w cytoplazmatycznych ziarnistościach. W obecności patogenów prokariotycznych w świetle jelita substancje te są uwalniane poza komórkę [8]. Do czynników przeciwdrobnoustrojowych, produkowanych przez komórki Panetha należą lizozym, fosfolipaza A2, tripsyna,  $\alpha$ -defensyny oraz angiogeniny [8, 31, 42].

W wyniku aktywacji genu *NOD2* następuje rozpoznanie i eliminacja bakterii przez komórki nabłonkowe jelita. W przypadku powstania mutacji prowadzącej do upośledzenia



RYCINA 8. Budowa białka *NOD2* (CARD15). Na N-końcu białka zlokalizowane są dwie domeny CARD (*Caspase Recruitment Domain*). Środkową część łańcucha polipeptydowego stanowi domena wiążąca nukleotyd (NOD), zaś C-końcowa część białka składa się z 11 powtórzeń bogatych w leucynę (LRR)

funkcji tego genu opisany proces ulega zaburzeniu. U chorych z najczęstszymi wariantami mutacji zaobserwowano nieprawidłową odpowiedź na pojawianie się PG i LPS (powstających w wyniku rozkładu składników bakteryjnych ścian komórkowych) w cytoplazmie komórek nabłonkowych jelita [18]. W rezultacie może dochodzić do spotęgowania reakcji zapalnych.

Ostatnio wykazano jednak, że prócz monocytów i komórek Panetha ekspresja NOD2 może zachodzić w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych człowieka [72].

### 4. 3. Budowa białka NOD2

Białko NOD2 zbudowane jest z czterech domen. Na N-końcu białka znajdują się dwie domeny CARD (*Caspase Recruitment Domain*). Za nimi umiejscowiona jest domena wiążąca nukleotyd (NOD). C-końcową część białka tworzy domena LRR, składająca się z 11 powtórzeń bogatych w leucynę. Ze względu na obecność domen CARD, komisja do spraw nazewnictwa HUGO (*Human Genome Organisation*) nadała genowi *NOD2* nazwę *CARD15* [44].

#### 4. 3. 1. Domena CARD

Domena CARD po raz pierwszy została opisana jako motyw wiążący białka, który oddziałuje z kaspazą poprzez wiązanie się z jej własną domeną CARD. Później domena ta została wykryta także w innych białkach nieoddziałujących bezpośrednio z kaspazami, a biorących udział w przekazywaniu sygnałów wywołujących apoptozę i aktywację czynnika NF- $\kappa$ B. Sygnały prowadzące do programowanej śmierci komórki są przenoszone dzięki oddziaływaniom pomiędzy domenami CARD białek uczestniczących w kaskadzie sygnałowej.

Także aktywacja kaspaz, które są obecne w komórce jako nieaktywne zymogeny, zachodzi dzięki cząsteczkom adaptorowym zawierającym domenę CARD. Ponadto białka zawierające tę domenę zaangażowane są w regulację ekspresji genów związanych z przetrwaniem komórki i odpowiedzią immunologiczną poprzez aktywację czynnika NF- $\kappa$ B [41, 79].

W przypadku białka *CARD15* znajdująca się na jego N-końcu domena CARD odpowiada za interakcję z domeną tego samego rodzaju, należąca do serynowo-treoninowej kinazy białkowej RICK (znanej też pod nazwą RIP2), która odpowiada za aktywację czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B [71].

#### 4. 3. 2. Domena NOD

Domeny NOD (nazywane też NACHT) to motywy o długości 300–400 aa mające właściwości trifosfatazy nukleotydu (NTP-azy). Znajdowane są w białkach zwierzęcych, grzybowych i bakteryjnych. U zwierząt domena NOD występuje w polipeptydach związanych z apoptozą i reakcjami systemu odpornościowego. Jednym z konserwatywnych motywów w obrębie tej domeny jest pętla P, charakterystyczna dla miejsc wiążących ATP/GTP (kaseta Walkera A) oraz miejsce wiążące jony  $Mg^{2+}$  (kaseta Walkera B). Specyficzną cechą domeny NOD, odróżniającą ją od innych domen o aktywności trifosfatazy nukleotydu, jest występowanie reszty aminokwasu o niskiej masie cząsteczkowej (glicyna, alanina, seryna) bezpośrednio po C-końcowej stronie

krytycznej dla działania kasety Walkera B reszty asparaginianu, w miejsce innego aminokwasu o charakterze kwasowym. Inną cechą charakterystyczną dla domeny NOD jest występowanie na jej C-końcu konserwatywnego motywu złożonego z aminokwasów polarnych, aromatycznych i hydrofobowych, niewystępującego w obrębie żadnej innej rodziny NTP-az [57].

Poprzez domenę NOD białka mają zdolność tworzenia homo- i heterodimerów. Oligomeryzacja NOD1, a zapewne i NOD2, ułatwia zbliżenie cząsteczki białka RICK oraz podjednostek kinazy I- $\kappa$ B (IKK), prowadząc do aktywacji IKK i NF- $\kappa$ B [23].

Aby ustalić udział domeny NOD w mechanizmie działania NOD2, przeprowadzono badania z użyciem syntetycznego dipeptydu muramyłowego i białek NOD2 z mutacjami w rejonie badanej domeny. Zamiana konserwatywnej reszty asparaginianu w pozycji 379 (D379A), gdzie znajduje się kasetka B Walkera (miejsce wiązania jonów magnezowych i hydrolizy nukleotydów [86]), sprawiała, że taki mutant nie reagował na MDP, co sugeruje, że hydroliza nukleotydu jest warunkiem aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B zależnej od MDP. Analogiczna mutacja w białku NOD1 (D284A) także blokuje zależną od ligandu aktywację NF- $\kappa$ B [79].

#### 4.3.3. Domena LRR

Motywy LRR występują w wielu białkach o różnych funkcjach. Głównym ich zadaniem jest stworzenie strukturalnego rusztowania umożliwiającego specyficzne oddziaływanie międzycząsteczkowe; najczęściej typu białko – białko [56].

Komputerowe modelowanie trójwymiarowej struktury domeny LRR białka NOD2 pozwoliło stwierdzić, że mutacje w obrębie genu *NOD2* kodującego ten region białka powodują utratę zdolności rozpoznawania ligandu. Ich skutkiem jest substytucja aminokwasów tworzących zwroty  $\alpha$ -helisy domeny LRR lub struktury typu  $\beta$ -kartki, formujące wklęsłą stronę domeny LRR. Wszystkie mutacje powodujące utratę funkcji białka dotyczyły reszt aminokwasowych należących do C-końcowych powtórzeń bogatych w leucynę – od LRR6 do LRR11. Wyniki tych badań jednoznacznie sugerują, że C-końcowe domeny LRR odpowiadają za rozpoznawanie motywów ściany komórkowej bakterii [79].

Opisano również wpływ mutacji w obrębie *NOD2* kodujących początkowe powtórzenia LRR oraz w regionie pomiędzy domenami NOD i LRR na upośledzenie funkcji białka NOD2.

### 4. 4. Polimorfizm genu *NOD*

Mutacje nonsensowne w obrębie domen CARD skutkują niezdolnością do aktywacji NF- $\kappa$ B. W C-końcowym odcinku regionu LRR (reszty aminokwasowe od 855 do 1040) mutacje takie nie upośledzają procesu aktywacji NF- $\kappa$ B, zakłócona jest jednak zdolność do rozpoznawania składników pochodzenia bakteryjnego. W przypadku występowania w komórce białek NOD2, których transkrypcja w wyniku mutacji nonsensownej kończy się w rejonie od 664 do 854 aa (C-końcowa część domeny NOD i N-końcowa LRR), obserwuje się podwyższoną aktywność podstawową czynnika NF- $\kappa$ B. Gdy jednak białko zakończone jest w rejonie C-końcowych LRR (reszty

aminokwasowe od 855 do 1040), aktywność podstawowa NF- $\kappa$ B pozostaje na normalnym poziomie. Stosując technikę immunodetekcji białek wykazano, że poziomy ekspresji nonsensownych mutantów *NOD2* nie odbiegają od poziomu ekspresji prawidłowego *NOD2* [79].

Badanie mutantów *NOD1* potwierdziło, że mechanizm aktywacji NF- $\kappa$ B jest konserwatywny u *NOD1* i *NOD2*. Białka *NOD1* o łańcuchach polipeptydowych kończących się w wyniku mutacji nonsensownych w C-końcowym rejonie domeny *NOD* i N-końcowych LRR również wywołują zwiększoną stałą aktywność NF- $\kappa$ B i brak reakcji na obecność specyficznego ligandu [79].

Sugeruje to, że omawiany region pełni funkcje regulatorowe, modulujące stopień aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B. Obecnie uważa się, że rejon C-końcowej części domeny *NOD* i N-końcowych LRR odpowiada za aktywację NF- $\kappa$ B, natomiast C-końcowe LRR, oprócz rozpoznawania składników ściany komórkowej bakterii, pełnią także funkcję inhibitora aktywności podstawowej (niezależnej od ligandu) *NOD1* i *NOD2*.

#### 4.5. Funkcje i regulacja działania *NOD2*

Główną funkcją białka *NOD2* jest rozpoznawanie pochodzącego ze ściany komórkowej bakterii muramylo-dipeptydu i uruchamianie kaskady sygnałowej prowadzącej do mobilizacji mechanizmów obrony immunologicznej. Muramylo-dipeptyd to składnik peptydoglikanu (PGN), charakterystyczny zarówno dla bakterii Gram ujemnych, jak i dodatnich.

PGN to skomplikowana makromolekuła, główny składnik ścian komórkowych bakterii, nadający im odporność na zewnętrzne ciśnienie osmotyczne. Bakteryjna osłona zbudowana z warstw PGN, mimo iż pełni funkcję ochronną, jest strukturą niezwykle dynamiczną, ulegającą ciągłym przemianom, związanym ze wzrostem i podziałem komórek. Na kształt trójwymiarowej struktury PGN mają wpływ obecne w niej enzymy: glikozylo-transferazy, transpeptydazy, D, D-karboksy-peptydazy i hydrolazy [40].

Po związaniu określonego ligandu *NOD2* ulega homodimeryzacji, po czym wchodzi za pomocą N-końcowej domeny CARD w interakcję z domeną tego samego rodzaju, należąca do serynowo-treoninowej kinazy białkowej RICK (znanej też pod nazwą RIP2) [50]. Kinaza RICK wiąże się z kompleksem kinazy I $\kappa$ B (IKK) poprzez podjednostkę  $\gamma$  IKK, aktywując IKK [50]. Fosforylacja I $\kappa$ B przez kinazy I $\kappa$ B (IKK) prowadzi do aktywacji NF- $\kappa$ B [55]. Białko blokujące I $\kappa$ B jest stabilnie związane z czynnikiem jądrowym NF- $\kappa$ B [10]. To oddziaływanie blokuje motyw NLS (sygnał lokalizacji jądrowej) NF- $\kappa$ B, dzięki czemu cały kompleks pozostaje w cytoplazmie [14]. Aktywacja NF- $\kappa$ B związana z odłączeniem cząsteczki I $\kappa$ B, odsłania sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), co pozwala na translokację NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego [9], gdzie inicjuje on ekspresję odpowiednich genów.

Czynnik jądrowy NF- $\kappa$ B wykryto w wielu typach komórek zarówno w tkankach prawidłowych, jak i w czasie stanów chorobowych. Jego działanie polega na aktywowaniu ekspresji genu przez przyłączanie się do specyficznych sekwencji DNA w obrębie

promotora. NF- $\kappa$ B stymuluje ekspresję genów kodujących chemokiny, regulatory transkrypcji, translacji i procesów proteolitycznych oraz białka sekrecyjne, takie jak składniki układu dopełniacza [81].

Za aktywację NF- $\kappa$ B może odpowiadać wiele różnorodnych czynników: cytokiny, wolne rodniki, promieniowanie UV, a także czynniki pochodzenia bakteryjnego i wirusowego. Anomalię aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B wiąże się z występowaniem stanów zapalnych obserwowanych w przypadku autoagresyjnego zapalenia stawów, astmy, szoku septycznego, zwłóknienia płuc, zapaleniu kłębuszków nerwowych, miażdżycy i AIDS. Z kolei całkowita lub długotrwała inaktywacja tego czynnika prowadzi do apoptozy, nieprawidłowego rozwoju komórek układu odpornościowego i opóźnienia wzrostu komórki [25].

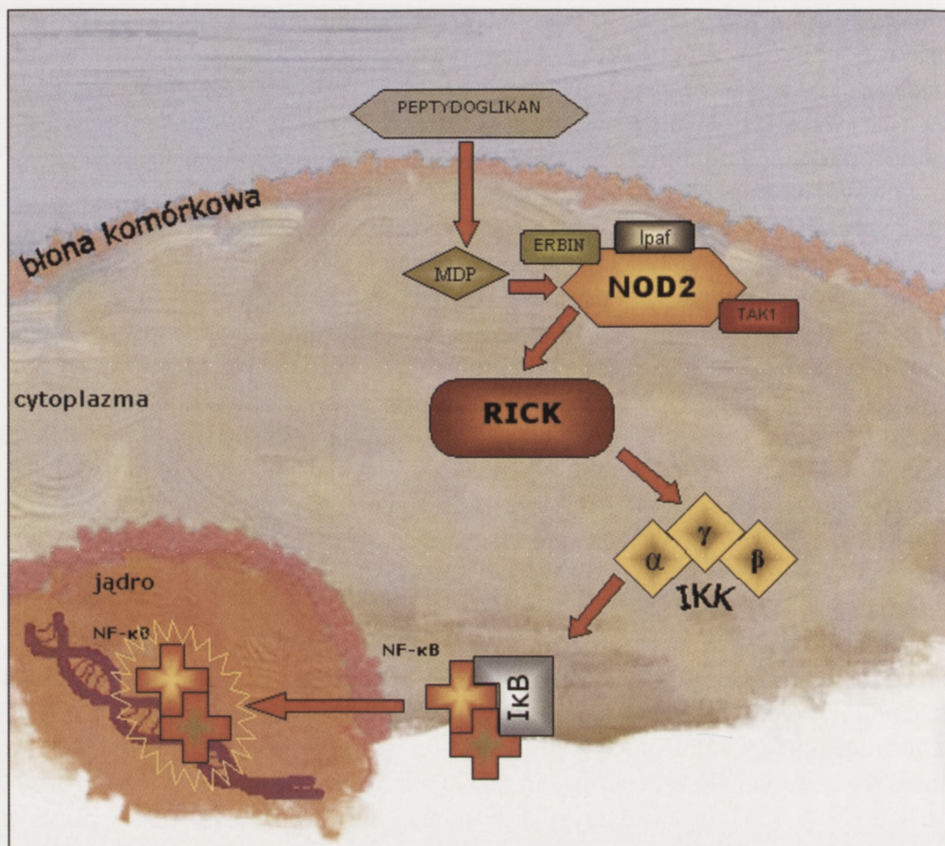
Wrażliwość komórek na MDP może być regulowana przez zmianę poziomu ekspresji genu *NOD2* lub też przez interakcje białka NOD2 z innymi polipeptydami, wpływającymi na jego aktywność. Na poziomie ekspresji *NOD2* regulowany jest przez czynnik martwicy nowotworów typu  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) oraz interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Pod wpływem TNF- $\alpha$  oraz IFN- $\gamma$  w komórkach nabłonka jelit następuje aktywacja ekspresji *NOD2*, co powoduje podwyższenie wrażliwości tych komórek na składniki ściany komórkowej bakterii [74].

Ostatnie poszukiwania potencjalnych regulatorów wpływających na poziom ekspresji *NOD2* doprowadziły do odkrycia kilku białek. Pierwszym z nich jest Ipaf (opisywane także pod nazwą CLAN lub CARD12). Poprzez tworzenie heterodimeru z CARD15, zachodzące przy udziale domen NOD, białko to reguluje aktywność NOD2, hamując przekazywanie sygnału prowadzącego do aktywacji NF- $\kappa$ B [27].

Chen i wsp. [24] opisali hamujące działanie NOD2 na proces aktywacji NF- $\kappa$ B zależny od kinazy TAK1 (*TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1*). Dzika forma białka NOD2, oddziałując poprzez swój region LRR z TAK1 hamuje zależną od tej kinazy aktywację czynnika NF- $\kappa$ B skuteczniej niż skrócona w wyniku mutacji 1007fs forma NOD2. Z drugiej strony obecność funkcjonalnej kinazy TAK1 okazała się być niezbędna do stymulowanej MDP, a zależnej od NOD2 aktywacji NF- $\kappa$ B [24].

Kolejnym białkiem oddziałującym z NOD2 zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* oraz wpływającym na jego aktywność jest ERBIN. Białko to zostało odkryte jako cząsteczka niezbędna do prawidłowej lokalizacji receptora ErbB2 w bazolateralnej części plazmolemy komórek nabłonkowych [19]. Wykazano także, że obniżona ekspresja *ERBIN* jest związana ze złymi rokowaniami we wczesnym pierwotnym raku piersi [6, 64, 85].

Przeprowadzona przez Barnicha i wsp. [12] analiza delecyjnych i substytucyjnych mutantów *NOD2* pozwoliła zaobserwować, że białkowy produkt tego genu ma zdolność przyłączania się do wewnętrznej strony plazmolemy komórek nabłonkowych jelita, podczas gdy mutant 3020insC (1007fs) charakteryzuje się brakiem takiej zdolności. Wykazano, że do aktywacji czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B po detekcji przez NOD2 obecności MDP w cytoplazmie komórek nabłonkowych jelita konieczne jest związanie NOD2 z błoną komórkową. Za przyłączanie się NOD2 do błony komórkowej odpowiadają dwie reszty leucynowe oraz motyw zawierający tryptofan zlokalizowane w pobliżu C-końca białka NOD2.



RYCINA 9. Zależna od NOD2 aktywacja NF-κB. MDP zostaje rozpoznany przez domenę LRR NOD2, który poprzez oddziaływanie pomiędzy domenami CARD, wiąże się z białkiem RICK. RICK posiadający aktywność kinazy ser/thr, oddziałuje z podjednostką gamma kompleksu IKK. Aktywowany IKK fosforyluje inhibitor NF-κB – IκB, powodując jego oddysocjowanie od NF-κB i jego transport do wnętrza jądra. W jądrze NF-κB aktywuje transkrypcję genów związanych z reakcją zapalną

NOD2 jest także zaangażowany w modulowanie zależnej od TLR reakcji na patogeny. W przeprowadzonych niedawno doświadczeniach Ferwerd i wsp. [29] wykazali, że do rozpoznania zakażenia prątkiem gruźlicy niezbędne jest działanie receptorów TLR oraz NOD2. Komórki jednojądrowe krwi osób z mutacją 1007fs w obu allelach genu *NOD2* w odpowiedzi na obecność *Mycobacterium tuberculosis* charakteryzowały się osłabieniem o 80% syntezy obronnych cytokin w porównaniu z osobami bez mutacji. Ponadto zaobserwowano synergistyczne działanie receptora wewnątrzkomórkowego NOD2 i zewnątrzkomórkowego TLR2 w procesie mobilizacji cytokin: TNF, IL-6 oraz IL-1β w odpowiedzi na obecność składników bakteryjnej ściany komórkowej. Zarówno w przypadku komórek z dysfunkcyjnym TLR2, jak i NOD2 synergii tej nie obserwowano. Leukocyty nosiciele mutacji w genie *NOD2* nie są więc w stanie odpowiednio zareagować na obecność prątków gruźlicy.



## PODSUMOWANIE

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazują ogromne znaczenie mało dotąd poznanych mechanizmów odporności nieswoistej w obronie organizmu przed mikroorganizmami patogennymi. Stwierdzono, że zwierzęce i roślinne receptory związane z funkcjonowaniem układu odporności wrodzonej zawierają domeny LRR, dzięki którym dochodzi do rozpoznania cząsteczek substancji związanych z atakiem patogena na organizm (PAMP). Zewnątrzkomórkowymi receptorami u zwierząt są receptory Toll-podobne, natomiast rolę receptorów wewnątrzkomórkowych pełnią białka z rodziny NOD. Przedstawiciel tej ostatniej grupy – NOD2, jest przykładem na to, jak ważna jest rola prawidłowego działania mechanizmów odporności wrodzonej. Nieprawidłowe funkcjonowanie tego białka, spowodowane mutacjami, wiąże się z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna, syndromu Blau'a, młodzieńczej postaci sarkoidozy, a także ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji typu przeszczep przeciwko gospodarzowi w przypadku allogenicznego przeszczepu szpiku kostnego i szoku septycznego u noworodków. Ponadto wykazano częstsze zachorowania na niektóre nowotwory u nosicieli mutacji w genie *NOD2*. Pomimo bardzo odległego pokrewieństwa filogenetycznego roślin i zwierząt, roślinne receptory wykrywające PAMP są niezwykle podobne do występujących u zwierząt. Oprócz domeny LRR zawierają one domenę NBD, homologiczną do domeny NOD. Część z nich zawiera także domenę TIR, która przypomina cytoplazmatyczną domenę receptorów TLR.

## LITERATURA

- [1] ABREU MT, VORA P, FAURE E, THOMAS LS, ARNOLD ET, ARDITI M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; **167**: 1609–1616.
- [2] AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; **2**: 675–680.
- [3] AKIRA S, YAMAMOTO M, TAKEDA K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 637–642.
- [4] AKIRA S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; **278**: 38105–38108.
- [5] ALBRECHT M, DOMINGUES FS, SCHREIBER S, LENGAUER T. Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS Lett* 2003; **554**: 520–528.
- [6] ATALAY A, CROOK T, OZTURK M, YULUG IG. Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **299**: 839–846.
- [7] ATHMAN R, PHILPOTT D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* 2004; **7**: 25–32.
- [8] AYABE T, SATCHELL DP, WILSON CL, PARKS WC, SELSTED ME, OUELLETTE AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000; **1**: 113–118.
- [9] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Cell* 1988; **53**: 211–217.

- [10] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. I $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Science* 1988; **242**: 540–546.
- [11] BAI J, PENNILL LA, NING J, LEE SW, RAMALINGAM J, WEBB CR, ZHAO B, SUN Q, NELSON JC, LEACH JE, HULBERT SH. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Res* 2002; **12**: 1871–1884.
- [12] BARNICH N, AGUIRRE JE, REINECKER HC, XAVIER R, PODOLSKY DK. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* 2005; **170**: 21–26.
- [13] BARTON GM, MEDZHITOV R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; **300**: 1524–1525.
- [14] BEG AA, RUBEN SM, SCHEINMAN RI, HASKILL S, ROSEN CA, BALDWIN AS Jr. I $\kappa$ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- $\kappa$ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 1992; **6**: 1899–1913.
- [15] BENT AF, KUNKEL BN, DAHLBECK D, BROWN KL, SCHMIDT R, GIRAUDAT J, LEUNG J, STASKAWICZ BJ. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 1994; **265**: 1856–1860.
- [16] BERGELSON J, KREITMAN M, STAHL EA, TIAN D. Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science* 2001; **292**: 2281–2285.
- [17] BLANDIN S, LEVASHINA EA. Mosquito immune responses against malaria parasites. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 16–20.
- [18] BONEN DK, OGURA Y, NICOLAE DL, INOHARA N, SAAB L, TANABE T, CHEN FF, FOSTER SJ, DUERR RH, BRANT SR, CHO JH, NUNEZ G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003; **124**: 140–146.
- [19] BORG JP, MARCHETTO S, LE BIVIC A, OLLENDORFF V, JAULIN-BASTARD F, SAITO H, FOURNIER E, ADELAIDE J, MARGOLIS B, BIRNBAUM D, ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 407–414.
- [20] BOYES DC, NAM J, DANGL JL. The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15849–15854.
- [21] CANNON SB, ZHU H, BAUMGARTEN AM, SPANGLER R, MAY G, COOK DR, YOUNG ND. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *J Mol Evol* 2002; **54**: 548–562.
- [22] CAVANAUGH J. The IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn's disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 1165–1171.
- [23] CHAMAILLARD M, GIRARDIN SE, VIALA J, PHILPOTT DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003; **5**: 581–592.
- [24] CHEN CM, GONG Y, ZHANG M, CHEN JJ. Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J Biol Chem* 2004; **279**: 25876–25882.
- [25] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X, DEMERS LM. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; **45**: 7–17.
- [26] CHO JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; **3**: S18–S22.
- [27] DAMIANO JS, OLIVEIRA V, WELSH K, REED JC. Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem J* 2004; **381**: 213–219.
- [28] DANGL JL, JONES JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 2001; **411**: 826–833.
- [29] FERWERDA G, GIRARDIN SE, KULLBERG BJ, LE BOURHIS L, de JONG DJ, LANGENBERG DM, van CREVEL R, ADEMA GJ, OTTENHOFF TH, van der MEER JW, NETEA MG. NOD2 and Toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2005; **1**: 34.
- [30] FLOR HH. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet* 1956; **8**: 29–54.
- [31] GANZ T. Paneth cells – guardians of the gut cell hatchery. *Nat Immunol* 2000; **1**: 99–100.
- [32] GAY NJ, KEITH FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; **351**: 355–356.
- [33] GEWIRTZ AT, NAVAS TA, LYONS S, GODOWSKI PJ, MADARA JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; **167**: 1882–1885.

- [34] GIRARDIN SE, TOURNEBIZE R, MAVRIS M, PAGE AL, LI X, STARK GR, BERTIN J, DISTEFANO PS, YANIV M, SANSONETTI PJ, PHILPOTT DJ. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2001; **2**: 736–742.
- [35] GUILLOT L, BALLOY V, MCCORMACK FX, GOLENBOCK DT, CHIGNARD M, SI-TAHAR M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002; **168**: 5989–5992.
- [36] GUILLOT L, MEDJANE S, LE-BARILLEC K, BALLOY V, DANIEL C, CHIGNARD M, SI-TAHAR M. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem* 2004; **279**: 2712–2718.
- [37] HAMMOND-KOSACK KE, JONES JD. Resistance genedependent plant defense responses. *Plant Cell* 1996; **8**: 1773–1791.
- [38] HARTON JA, LINHOFF MW, ZHANG J, TING JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* 2002; **169**: 4088–4093.
- [39] HEGUY A, BALDARI CT, MACCHIA G, TELFORD JL, MELLI M. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the *Drosophila* toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2605–2609.
- [40] HOLTJE JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62**: 181–203.
- [41] HONG GS, JUNG YK. Caspase recruitment domain (CARD) as a bi-functional switch of caspase regulation and NF-kappaB signals. *J Biochem Mol Biol* 2002; **35**: 19–23.
- [42] HOOPER LV, STAPPENBECK TS, HONG CV, GORDON JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003; **4**: 269–273.
- [43] HORNEF MW, NORMARK BH, VANDEWALLE A, NORMARK S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2003; **198**: 1225–1235.
- [44] [http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get\\_data.php?hgnc\\_id=HGNC:5331](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=HGNC:5331)
- [45] HUGOT JP, CHAMAILLARD M, ZOUALI H, LESAGE S, CEZARD JP, BELAICHE J, ALMER S, TYSK C, O'MORAIN CA, GASSULL M, BINDER V, FINKEL Y, CORTOT A, MODIGLIANI R, LAURENT-PUIG P, GOWER-ROUSSEAU C, MACRY J, COLOMBEL JF, SAHBATOU M, THOMAS G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; **411**: 599–603.
- [46] HUGOT JP, LAURENT-PUIG P, GOWER-ROUSSEAU C, OLSON JM, LEE JC, BEAUGERIE L, NAOMI I, DUPAS JL, VAN GOSSUM A, ORHOLM M, BONAÏTI-PELLIE C, WEISSENBACH J, MATHEW CG, LENNARD-JONES JE, CORTOT A, COLOMBEL JF, THOMAS G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; **379**: 772–773.
- [47] HULBERT SH, WEBB CA, SMITH SM, SUN Q. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol* 2001; **39**: 285–312.
- [48] HWANG CF, WILLIAMSON VM. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. *Plant J* 2003; **34**: 585–593.
- [49] INOHARA N, KOSEKI T, del PESO L, HU Y, YEE C, CHEN S, CARRIO R, MERINO J, LIU D, NI J, NUNEZ G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; **274**: 14560–14567.
- [50] INOHARA N, KOSEKI T, LIN J, DEL PESO L, LUCAS PC, CHEN FF, OGURA Y, NUNEZ G. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; **275**: 27823–27831.
- [51] INOHARA N, OGURA Y, NUNEZ G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 76–80.
- [52] JAKÓBISIAK M, GOŁĄB J. Odporność nieswoista. [w] Gołąb J, Jakóbiśiak M, Lasek W [red.] *Immunologia*. Wyd Nauk PWN, Warszawa 2005: 137–156.
- [53] JIA Y, MCADAMS SA, BRYAN GT, HERSHEY HP, VALENT B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 2000; **19**: 4004–4014.
- [54] JONES JD. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 281–287.
- [55] KARIN M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27339–27342.
- [56] KOBE B, KAJAVA AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001; **11**: 725–732.

- [56] KOONIN EV, ARAVIND L. The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 223–224.
- [57] KURTZ J. Sex, parasites and resistance – an evolutionary approach. *Zoology (Jena)* 2003; **106**: 327–339.
- [58] LALA S, OGURA Y, OSBORNE C, HOR SY, BROMFIELD A, DAVIES S, OGUNBIYI O, NUNEZ G, KESHAV S. Crohn's disease and *NOD2* gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 2003; **125**: 47–57.
- [59] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973–983.
- [60] LUBIŃSKI J, HUZARSKI T, KURZAWSKI G, SUCHY J, MASOJC B, MIERZEJEWSKI M, LENER M, DOMAGAŁA W, CHOSIA M, TEODORCZYK U, MĘDREK K, DĘBNIAK T, ZŁOWOCKA E, GRONWALD J, BYRSKI T, GRABOWSKA E, NEJ K, SZYMAŃSKA A, SZYMAŃSKA J, MATYJASIK J, CYBULSKI C, JAKUBOWSKA A, GÓRSKI B, NAROD SA. The 3020insC allele of *NOD2* predisposes to cancers of multiple organs. *Hered Cancer Clin Pract* 2005; **3**: 59–63.
- [61] LUDERER R, RIVAS S, NURNBERGER T, MATTEI B, VAN DEN HOOVEN HW, Van der HOORN RA, ROMEIS T, WEHRFRITZ JM, BLUME B, NENNSTIEL D, ZUIDEMA D, VERVOORT J, de LORENZO G, JONES JD, de WIT PJ, JOOSTEN MH. No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; **14**: 867–876.
- [62] MATZINGER P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; **296**: 301–305.
- [63] McDONALD C, CHEN FF, OLLENDORFF V, OGURA Y, MARCHETTO S, LECINE P, BORG JP, NUNEZ G. A Role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *J Biol Chem* 2005; **280**: 40301–40309.
- [64] McDOWELL JM, CUZICK A, CAN C, BEYNON J, DANGL JL, PAN Q, WENDEL J, FLUHR R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol* 2000; **50**: 203–213.
- [65] MEYERS BC, DICKERMAN AW, MICHELMORE RW, SIVARAMAKRISHNAN S, SOBRAL BW, YOUNG ND. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 1999; **2**: 317–332.
- [66] MEYERS BC, KOZIK A, GRIEGO A, KUANG H, MICHELMORE RW. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2003; **15**: 809–834.
- [67] MORTON NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955; **7**: 277–318.
- [68] NUSSLEIN-VOLHARD C, LOHS-SCHARDIN M, SANDER K, CREMER C. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature* 1980; **283**: 474–476.
- [69] OGURA Y, BONEN DK, INOHARA N, NICOLAE DL, CHEN FF, RAMOS R, BRITTON H, MORAN T, KARALIUSKAS R, DUERR RH, ACHKAR JP, BRANT SR, BAYLESS TM, KIRSCHNER BS, HANAUER SB, NUNEZ G, CHO JH. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; **411**: 603–606.
- [70] OGURA Y, INOHARA N, BENITO A, CHEN FF, YAMAOKA S, NUNEZ G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2001; **276**: 4812–4818.
- [71] OH HM, LEE HJ, SEO GS, CHOI EY, KWEON SH, CHUN CH, HAN WC, LEE KM, LEE MS, CHOI SC, JUN CD. Induction and localization of NOD2 protein in human endothelial cells. *Cell Immunol* 2005; **237**: 37–44.
- [72] RICHLY E, KURTH J, LEISTER D. Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol Biol Evol* 2002; **19**: 76–84.
- [73] ROSENSTIEL P, FANTINI M, BRAUTIGAM K, KUHBACHER T, WAETZIG GH, SEEGER D, SCHREIBER S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; **124**: 1001–1009.
- [74] SARASTE M, SIBBALD PR, WITTINGHOFER A. The P-loop: A common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**: 430–434.
- [75] SATSANGI J, MORECROFT J, SHAH NB, NIMMO E. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterology* 2003; **17**: 3–18.
- [76] STASKAWICZ BJ, AUSUBEL FM., BAKER BJ, ELLIS JG, JONES JDG. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 1995; **268**: 661–667.

- [77] TAMELING WI, ELZINGA SD, DARMIN PS, VOSSEN JH, TAKKEN FL, HARING MA, CORNELISSEN BJ. The tomato *R* gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 2002; **14**: 2929–2939.
- [78] TANABE T, CHAMAILLARD M, OGURA Y, ZHU L, QIU S, MASUMOTO J, GHOSH P, MORAN A, PREDERGAST MM, TROMP G, WILLIAMS CJ, INOHARA N, NUNEZ G. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* 2004; **23**: 1587–1597.
- [79] TAYLOR KR, TROWBRIDGE JM, RUDISILL JA, TERMEER CC, SIMON JC, GALLO RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 2004; **279**: 17079–17084.
- [80] TIAN B, BRASIER AR. Identification of a nuclear factor kappa beta-dependent gene network. *Recent Prog Horm Res* 2003; **58**: 95–130.
- [81] ULEVITCH RJ, MATHISON JC, da SILVA CORREIA J. Innate immune responses during infection. *Vaccine* 2004; **22**: S25–S30.
- [82] VABULAS RM, WAGNER H, SCHILD H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; **270**: 169–184.
- [83] Van der BIEZEN EA, JONES JD. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**: 454–456.
- [84] van 'T VEER LJ, DAI H, van de VIJVER MJ, HE YD, HART AA, MAO M, PETERSE HL, van der KOOY K, MARTON MJ, WITTEVEEN AT, SCHREIBER GJ, KERKHOVEN RM, ROBERTS C, LINSLEY PS, BERNARDS R, FRIEND SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; **415**: 530–536.
- [85] WALKER JE, SARASTE M, RUNSWICK MJ, GAY NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982; **1**: 945–951.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 25.04. 2006 r.*  
*Przyjęto: 24.07. 2006 r.*  
*ul. Gagarina 11, 87-100 Toruń*  
*e-mail: prat@uni.torun.pl*



## ROLA PIERWOTNYCH POMP METALOWYCH ( $P_{1B}$ -ATPaz) W UTRZYMYWANIU HOMEOSTAZY METALI CIĘŻKICH W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH\*

THE ROLE OF PRIMARY METAL PUMPS ( $P_{1B}$ -ATPases) IN THE MAINTAINING OF HEAVY METALS HOMEOSTASIS IN PLANT CELLS

Magdalena MIGOCKA

Instytut Biologii Roślin, Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

**Streszczenie:**  $P_{1B}$ -ATPazy, należące do rodziny P-ATPaz, transportują metale ciężkie przez błony komórkowe wykorzystując ATP jako źródło energii. W związku z pełnią funkcję mają specyficzne motywy strukturalne (motyw Cys-Pro-Cys/His/Ser) lub fragmenty bogate w His, które mogą odpowiadać za przyłączanie i przenoszenie jonu metalowego. Rośliny, w porównaniu z innymi organizmami, mają więcej P-ATPaz typu  $P_{1B}$ . W związku z tym przypuszcza się, że roślinne pompy metalowe wykazują zróżnicowanie zarówno pod względem pełnionych funkcji, jak i rozmieszczenia w komórce. Badania z ostatnich lat potwierdzają te przypuszczenia, wskazując na potencjalną rolę tych białek w dystrybucji metali w obrębie komórek i tkanek oraz w usuwaniu nadmiaru jonów metalowych poza obszar cytoplazmy. Poszczególne białka tej podrodziny wykazują przy tym odmienne powinowactwo do różnych metali. W pracy zebrano dotychczasowe dane dotyczące  $P_{1B}$ -ATPaz, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w utrzymaniu równowagi metali ciężkich w komórce roślinnej: udziału w żywieniu mineralnym roślin i detoksykacji komórek roślinnych w warunkach nadmiaru metali ciężkich w środowisku.

**Słowa kluczowe:** metale ciężkie, transportery pierwotne, ATP-azy.

**Summary:** The sub-family of the P-type ATPases superfamily,  $P_{1B}$ -ATPases, comprises primary metal transporters using ATP as the source of energy. According to their function, they contain the specific structural motifs (Cys-Pro-Cys/His/Ser motif) and His rich domains, that may participate in metal binding and transport across the membranes. Higher plants possess more  $P_{1B}$ -ATPases than do other organisms and these are located in different cell membranes and tissues having a variety of tasks. It was shown that plant  $P_{1B}$ -ATPases play a crucial role in the distribution of metals inside the cells and tissues as well as in the exclusion of toxic metals from the cytosol. According to this, the different metal specificity was revealed for various members of plant  $P_{1B}$ -ATPases. We present the family of  $P_{1B}$ -ATPases with emphasis on the role of plant metal pumps in maintaining of metal homeostasis: delivery of the essential metals to target proteins and detoxification of cell from the heavy metals excess.

**Keywords:** heavy metals, primary transporters, ATPases.

\*Praca częściowo finansowana przez Komitet Badań Naukowych (grant nr 2P04C 123 29).

## WSTĘP

W ostatnich latach obserwujemy stale wzrastające zanieczyszczenie gleb uprawnych metalami ciężkimi. Wynika to przede wszystkim z przemysłowej i rolniczej działalności człowieka. Wiele nawozów stosowanych w rolnictwie zawiera w swoim składzie takie metale ciężkie, jak Pb i Cd, stąd zanieczyszczenie spowodowane tymi metalami występuje powszechnie na użytkach rolnych. Rośliny jako organizmy nieprzemieszczające się w trakcie całego cyklu życiowego są szczególnie narażone na nadmiar jonów metali ciężkich w glebie. Toksyczne stężenia metali objawiają się u roślin takimi symptomami, jak: chlorozy i nekrozy, karłowacenie, odbarwienie liści czy zahamowanie wzrostu korzeni [22]. Na poziomie subkomórkowym metale ciężkie mogą zaburzać aktywności enzymów lub funkcje białek strukturalnych, poprzez wiązanie do ich grup aminowych, karboksylowych i sulfhydrylowych. Konsekwencją nadmiernego pobierania metali ciężkich przez roślinę może być również deficyt innych, niezbędnych dla prawidłowego metabolizmu jonów, zaburzanie procesów transportu komórkowego i stres oksydacyjny [22]. Z drugiej strony, większość metali pełni istotne funkcje w metabolizmie roślinnym. Rośliny musiały zatem rozwinąć bardzo precyzyjne mechanizmy utrzymujące stężenie jonów metali ciężkich w cytosolu na odpowiednim poziomie. Kluczową rolę odgrywają tu procesy transportu metali przez zewnętrzne i wewnętrzne błony komórkowe. Są one bardzo efektywne u hyperakumulatorów, roślin wykorzystujących wyspecjalizowane błonowe systemy transportowe do usuwania nadmiaru metali do wakuoli lub apoplastu. Szczególną rolę w regulacji komórkowej homeostazy metali ciężkich przypisuje się w ostatnich latach pierwotnym transporterom metali ciężkich z podrodziny  $P_{1B}$ -ATPaz należącej do grupy P-ATPaz. Wydaje się, że to właśnie pompy metalowe odpowiadają w dużej mierze za dystrybucję i/lub wydalanie jonów metali ciężkich z komórek roślinnych [23]. Z uwagi na liczne doniesienia, opisujące badania nad poszczególnymi białkami tej podrodziny, w artykule zebrano dotychczasowe wyniki i wnioski dotyczące charakterystyki, budowy i przewidywanej funkcji  $P_{1B}$ -ATPaz u roślin.

## $P_{1B}$ -ATPazy W ŚWIECIE ŻYWYM

Dotychczasowe badania wykazały, że pompy metalowe wyodrębniły się wcześniej w procesie ewolucji jako osobna podrodzina z grupy P-ATPaz [3]. Obecność  $P_{1B}$ -ATPaz wykazano zarówno u *Archea*, jak i u *Eucaryota*, a zatem u organizmów tak różnych, jak: bakterie, drożdże, rośliny i człowiek [3]. Pierwsze doniesienia dotyczące charakterystyki  $P_{1B}$ -ATPaz pochodziły z badań opisujących dwie miedziowe ATPazy: CopA i CopB u *Enterococcus hirae* [18]. Wykazano wtedy, że CopA uczestniczy w imporcie Cu(I) do komórki w warunkach deficytu miedzi w środowisku, natomiast CopB wyrzuca Cu(I) na zewnątrz w warunkach nadmiaru tego metalu w komórce. Białka te wykazywały również powinowactwo do Ag(I). Do podrodziny pomp metalowych należą również dwie ludzkie P-ATPazy miedziowe: ATP7A i ATP7B [6]. Dysfunkcja tych białek powoduje

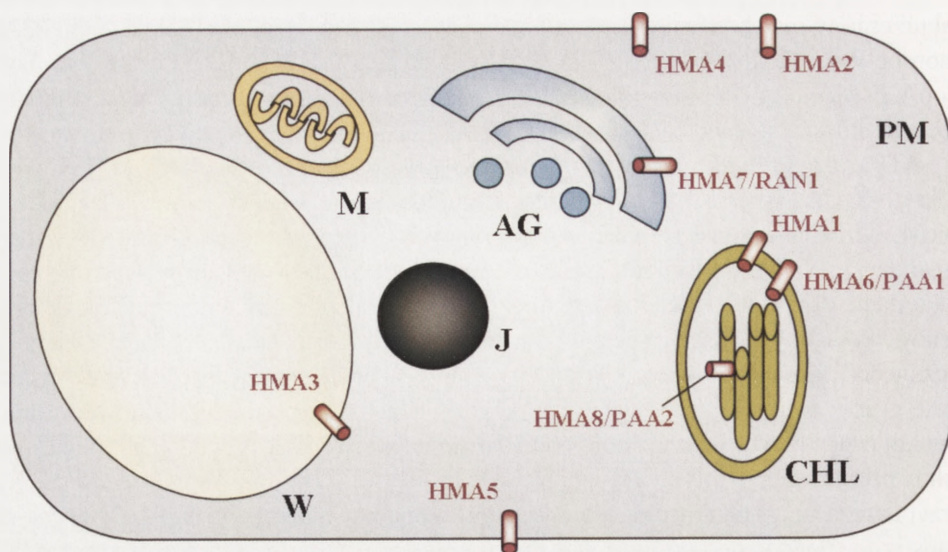


zaburzenia w metabolizmie miedzi u człowieka: chorobę Menkesa (defekt w ATP7A) i chorobę Wilsona (defekt w ATP7B) [6]. Obydwie ATPazy są podobne w 40% do białka CopA *E. hirae* [22]. Zidentyfikowane u drożdży białko CCC2, transportujące miedź do pęcherzyków Golgiego, to także ATPaza typu P<sub>1B</sub> [22]. Pierwszą zidentyfikowaną roślinną P<sub>1B</sub>-ATPazą było białko PAA1 *Arabidopsis thaliana* [22]. Później, u tej samej rośliny, odkryto RAN1, pompę metalową przenoszącą do pęcherzyków systemu wydzielniczego miedź, niezbędną do syntezy funkcjonalnie czynnych receptorów etylenu [23]. Wykorzystanie nowoczesnych metod biologii molekularnej oraz wyników badań prowadzonych na bakteriach, drożdżach i zwierzętach umożliwiło w ostatnich latach identyfikację licznych genów, kodujących pompy metalowe u roślin: rzodkiewnika (osiem), ryżu (dziewięć), jęczmienia (dziesięć), tobołków, kukurydzy i glonów. W podrodzynie tych białek wyodrębniono dwie grupy: pierwsza grupa obejmuje ATPazy transportujące metale jednowartościowe Cu/Ag; druga przenosi przez błony jony dwuwartościowe Zn/Cd/Pb/Co [2]. Co ciekawe, tylko prokaryoty i fotosyntetyzujące eukaryoty mają drugą podgrupę P<sub>1B</sub>-ATPaz. Przypuszcza się, że rośliny mogły nabyć geny kodujące te białka w wyniku horyzontalnego transferu genów od prokariotycznego endosymbionta, który dał początek plastydom [23]. Stosunkowo duża liczba genów kodujących metalowe ATPazy u roślin wyższych sugeruje, że białka tej podrodziny mogą być zróżnicowane zarówno pod względem pełnionej funkcji, jak i miejsca występowania w komórce. Na rycinie 1 przedstawiono prawdopodobne wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie roślinnych P<sub>1B</sub>-ATPaz.

## STRUKTURA P<sub>1B</sub>-ATPaz.

Jako białka należące do większej rodziny P-ATPaz, pompy metalowe mają domeny charakterystyczne dla tej grupy białek, jak również fragmenty specyficzne tylko dla swojej podgrupy. Przypuszcza się, że P<sub>1B</sub>-ATPazy mają 8 domen transbłonowych, podczas gdy Ca-ATPazy, należące do tej samej rodziny, mają ich 10 [12]. W strukturze Ca-ATPaz występują dwie pętli skierowane do cytoplazmy: mała, między helisami 2 i 3, oraz duża, między helisami 4 i 5. Podobnie jest u P<sub>1B</sub>-ATPaz z tą różnicą, że mała pętla oddziela helisy 4 i 5, a duża 6 i 7 (ryc. 2). U wszystkich P-ATPaz, włączając pompy metalowe, występuje domena P, składająca się z trzech charakterystycznych motywów: motywu DKTGT(LIVM)(TIS), zawierającego resztę asparaginianową podlegającą fosforylacji podczas wiązania ATP, motywu GDGxNDxP, który może wiązać Mg<sup>2+</sup>, oraz motywu PxxK, który może wchodzić w interakcję z tlenem pochodzącym od reszty fosforanowej ATP [23]. Również domena A, zawierająca specyficzny motyw S/TGE, który prawdopodobnie reguluje stan otwarcia/zamknięcia pomp ATPazowych, jest obecna w pompach metalowych [23]. Natomiast cechą charakterystyczną tylko dla P<sub>1B</sub>-ATPaz jest obecność dwóch specyficznych elementów strukturalnych [23]:

1. motywu CPx w transbłonowej domenie 6 (cysteina-prolina-histydyna/cysteina/seryna), który uczestniczy w transporcie metali przez błonę komórkową;



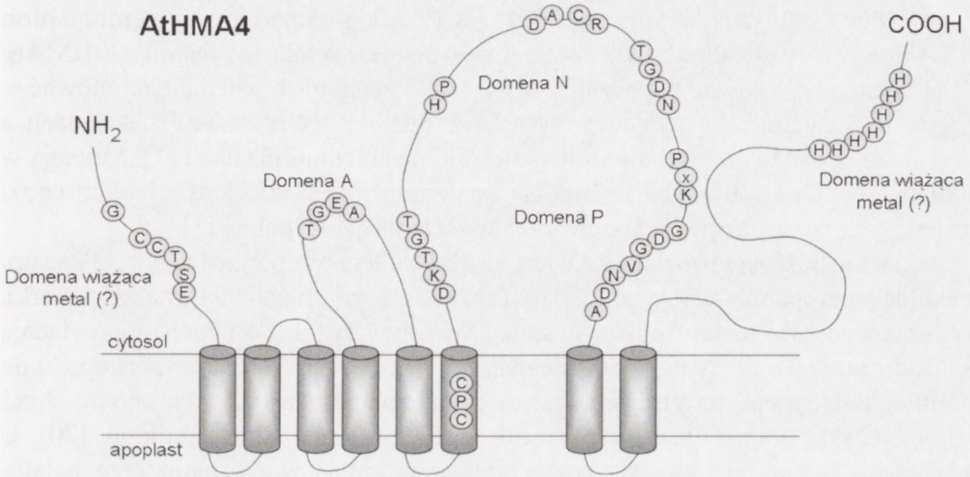
RYCINA 1. Przewidywane wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie białek z rodziny  $P_{1B}$ -ATPaz (wg Williams i Mills [23], zmodyfikowane): Uproszczona komórka zawiera wakuolę (W), aparat Golgiego (AG), jądro (J), chloroplast (CHL) i mitochondrium (M), otoczone zewnętrzną błoną komórkową (PM). Zaproponowano następujące funkcje dla poszczególnych białek: HMA6 i HMA8 transportują Cu do stromy i światła tylakoidów, gdzie metal wbudowywany jest w metaloproteiny (Cu/Zn dysmutazę nadtlenkową, plastocyaninę) [1]; Hma7 transportuje Cu do cystern aparatów Golgiego, gdzie metal zużywany jest do syntezy funkcjonalnie czynnego receptora etylenu ETR1 [9]; Hma2 i Hma4 usuwają nadmiar Cu i Zn do apoplastu, biorąc udział w detoksykacji komórki [12, 21]; Hma1 może dostarczać Zn do chloroplastów, natomiast Hma3 i Hma5 mogą uczestniczyć w detoksykacji komórki z Pb i Cd (Hma3) oraz Cu (Hma5), w warunkach zwiększonego stężenia tych metali w środowisku [23]

2. locus HP; obecne tu konserwatywne reszty histydynowe i glutaminianowe mogą współtworzyć miejsce wiążące ATP.

Poza tym, w obrębie odcinków N- i C-końcowych  $P_{1B}$ -ATPaz występują specyficzne domeny wiążące jony metali. Należą tu: domena HMA (*Heavy-Metal Associated*) z charakterystycznym motywem CxxC (od której przyjęto obecnie stosowane nazewnictwo dla roślinnych pomp metalowych) oraz regiony bogate w reszty histydynowe i cysteinowe [23]. Z pozostałych właściwości strukturalnych odróżniających  $P_{1B}$ -ATPazy od reszty P-ATPaz należy wymienić krótszą i bardziej zmienną domenę wiążącą nukleotyd oraz znacznie krótszy region, oddzielający odcinki DKTGT i GDGxNDxP w domenie P [23].

## FIZJOLOGICZNA ROLA $P_{1B}$ -ATPaz U ROŚLIN

Badania nad modelową rośliną *Arabidopsis thaliana* przybliżyły znaczenie pomp metalowych w transporcie i utrzymywaniu homeostazy metali ciężkich u roślin. *Arabidopsis* ma 8  $P_{1B}$ -ATPaz: AtHMA1-AtHMA5, AtHMA6 (znana także jako PAA1), AtHMA7 (znana także jako RAN1) i AtHMA8 (znana także jako PAA2). Są



RYCINA 2. Model strukturalny białka należącego do  $P_{IB}$ -ATPaz, AtHMA4 (wg Williams i Mills [23], zmodyfikowany): Białko składa się prawdopodobnie z ośmiu transbłonowych domen, przy czym w domenie 6 występuje motyw CPC, charakterystyczny tylko dla  $P_{IB}$ -ATPaz. Pętle cytoplazmatyczne oraz N- i C-końce łańcucha polipeptydowego skierowane są do wnętrza komórki. Motywy charakterystyczne dla P-ATPaz to: domena wiążąca nukleotyd (domena N), domena podlegająca fosforylacji (domena P) oraz domena regulująca stan otwarcia/zamknięcia kanału (domena A). W domenach N- i C-końcowych występują sekwencje charakterystyczne dla pompy HMA4, które mogą odpowiadać za wiązanie jonów metalowych

to białka zróżnicowane pod względem występowania w tkankach i błonach komórkowych, specyficzności substratowej i regulacji. To zróżnicowanie wskazuje na różnorodność funkcji, jakie pompy metalowe pełnią u roślin. W celu wyjaśnienia, jakie metale są transportowane przez roślinne pompy metalowe oraz jakiego rodzaju związek zachodzi pomiędzy strukturą tych białek a ich funkcją, przeprowadzono heterologiczną ekspresję wybranych przedstawicieli  $P_{IB}$ -ATPaz *Arabidopsis* w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* i *Escherichia coli*. Na podstawie tych badań wykazano, że roślinne  $P_{IB}$ -ATPazy mogą spełniać funkcje o dwojakim charakterze [23], dostarczając metale niezbędne dla prawidłowego metabolizmu roślinnego do kompartmentów komórkowych i odpowiednich białek oraz usuwając metale z komórek w warunkach stresu metali ciężkich w środowisku.

W zaopatrzeniu rośliny w niezbędne metale biorą udział dwie pompy metalowe zidentyfikowane u *Arabidopsis thaliana*: AtHMA6 i AtHMA8. Dowiedziono, że te blisko spokrewnione ze sobą białka, nazywane także odpowiednio PAA1 i PAA2, pełnią kluczową rolę w transporcie Cu do miedzio-zależnych białek w chloroplastach [1, 19]. Obydwa białka występują w odmiennych błonach chloroplastowych. AtHMA6/PAA1 to białko związane z zewnętrzną błoną chloroplastową, transportujące miedź do stromy. Kiedy miedź znajdzie się w stromie chloroplastów, może być wykorzystana do syntezy

Zn/Cu-dysmutazy nadtlenkowej lub przeniesiona dalej, do światła tylakoidów. Za ten drugi proces odpowiada pompa AtHMA8/PAA2, związana z systemem błon tylakoidowych. W tylakoidach Cu wbudowywana jest w plastocyaninę. AtHMA6/PAA1 występuje zarówno w pędach, jak i w korzeniach, może więc funkcjonować w zielonych i niezielonych plastydach [1]. AtHMA8/PAA2 obecna jest tylko w pędach, a więc może być aktywna tylko w fotosyntetyzujących chloroplastach [1]. Mutacja w obydwu genach kodujących te białka jest letalna dla *Arabidopsis*, co dowodzi ogromnego znaczenia obydwu pomp metalowych dla życia rośliny [1].

Ciekawym odkryciem ostatnich lat jest możliwa interakcja pomiędzy  $P_{1B}$ -ATPazami i metalochaperonami – wolnymi białkami przenoszącymi metale wewnątrz komórki. Wykazano, że dwie pompy metalowe sinicy *Synechocystis*, CtaA i PacS, odpowiadają za dostarczanie Cu do syntezy plastocyaniny [20]. Pompa CtaA transportuje Cu do komórki, gdzie metal przyłączany jest do metalochaperonu Atx1. Następnie, Atx1 przenosi Cu do pompy PacS, transportującej metal do światła tylakoidów [20]. U *Arabidopsis* zidentyfikowano niedawno białko chloroplastowe o charakterze metalochaperonu, AtCCS1, które może być funkcjonalnym homologiem Atx1 [23]. Można przypuszczać, że roślinne pompy AtHMA6/PAA1 i AtHMA8/PAA2 funkcjonują podobnie jak sinicowe białka CtaA i PacS [20], z pośrednictwem chloroplastowego metalochaperonu AtCCS1 [23]. Nie ma jednak dowodów na interakcję AtCCS1 z chloroplastowymi  $P_{1B}$ -ATPazami. Chociaż postuluje się istnienie większej liczby metalochaperonów u roślin, jak dotąd zidentyfikowano niewiele białek tego typu u *A. thaliana* (np. AtCCH1 i AtCOX170) [4,17].

Pompa metalowa AtHMA7/RAN1 była pierwszą roślinną  $P_{1B}$ -ATPazą, którą opisano pod względem funkcjonalnym [9]. Tak jak AtHMA6/PAA1 i AtHMA8/PAA2, pompa ta również uczestniczy w dostarczaniu miedzi do białek, których aktywność zależy od obecności tego metalu [9]. Pod względem budowy pompa AtHMA7/RAN1 przypomina pompy miedziowe występujące u drożdży (CCC2) i człowieka (ATP7A i ATP7B) [9]. Wydaje się, że szlaki transportu miedzi z udziałem roślinnej AtHMA7/RAN1 i drożdżowej CCC2 są podobne. Obydwie pompy występują w błonach pęcherzyków Golgiego. Prawdopodobnie białko o charakterze metalochaperonu dostarcza Cu, obecną w cytoplazmie, do pomp metalowych systemu pęcherzyków Golgiego, a te z kolei przenoszą metal do światła pęcherzyków [9]. Tutaj metal może być wykorzystywany do syntezy receptora etylenu ETR1 [9]. Obecność miedzi w homodimerze ETR1 warunkuje wysokie powinowactwo receptora do etylenu [15]. Jednakże dowody na obecność AtHMA7/RAN1 w pęcherzykach Golgiego i udział tego białka w transporcie miedzi do pęcherzyków nie są wystarczające. Doświadczenia z mutantami upośledzonymi pod względem ekspresji AtHMA7/RAN1 wskazują, że białko to może być także zaangażowane we wzrost komórki, bowiem mutanty *AtHMA7/RAN1* były letalne na poziomie rozety [23]. W procesie starzenia zmienia się ekspresja genu kodującego AtHMA7/RAN1, co może wskazywać na udział pompy w mobilizacji miedzi ze starzejących się liści [10].

AtHMA4 była pierwszą pompą metalową z podgrupy Zn/Cd/Co/Pb, której funkcję określono poprzez heterologiczną ekspresję tego białka u drożdży i bakterii [12].

Wykazano wówczas prawdopodobny udział tej pompy w wydalaniu Zn przez plazmolemę do apoplastu [12, 13]. Podobną rolę spełniała kolejna pompa należąca do tej samej podgrupy, AtHMA2 [7, 23]. Mutanty *Arabidopsis* z zaburzeniami w biosyntezie AtHMA2 i AtHMA4 cechowały się karłowatością i chlorozami [11]. Objawy te ustępowały, gdy zaopatrzone mutanty w takie stężenia cynku, które dla zdrowych roślin są toksyczne [11]. Opisane cechy fenotypowe objawiały się tylko u roślin z podwójną mutacją genów kodujących AtHMA2 i AtHMA4, co sugeruje, że białka te uzupełniają się wzajemnie pod względem funkcji pełnionej w komórkach [11]. Podwójne mutanty gromadziły duże ilości Zn w korzeniach, ale nie w pędach [11]. Wykazano, że pompa metalowa AtHMA4 występuje w komórkach walca osiowego otaczających układ wiązek przewodzących korzenia [21]. W związku z tym przypuszcza się, że AtHMA4 w korzeniu może odpowiadać za transport Zn z komórek miękiszowych otaczających naczynia do naczyń [21]. Rezultaty badań, wykazujące obecność AtHMA2 w zewnętrznej błonie komórkowej, pozwalają przypuszczać, że białko to także bierze udział w międzykomórkowym transporcie metali [11]. Uczestnicząc w załadunku cynku do naczyń, białka AtHMA4 i AtHMA2 mogą regulować daleki transport metalu do pędów. Białka te zidentyfikowano także w tkankach floemu (gdzie mogą odpowiadać za załadunek lub rozładunek tej tkanki z Zn), w rozwijających się pręcikach i w podstawie kształtujących się łuszczynek (gdzie mogą uczestniczyć w zaopatrzeniu nasion w Zn) [23].

Udział w zaopatrywaniu roślin w niezbędne metale to nie jedyna funkcja pełniona przez AtHMA4. Badania na drożdżach wykazały, że pompa ta może transportować zarówno Zn, jak i Cd [12, 13]. Mutant *Arabidopsis*, niezdolny do syntezy AtHMA4, cechował się, w porównaniu z dzikim typem, znacznym zahamowaniem wzrostu w warunkach nadmiaru Zn i Cd w środowisku [13]. Natomiast nadekspresja genu kodującego AtHMA4 u *Arabidopsis* powodowała zwiększoną tolerancję rośliny na Co [12, 21]. Powyższe doniesienia wskazują na możliwy udział AtHMA4 w detoksykacji komórek roślinnych z nadmiaru Zn, Cd i Co.

Podobną rolę może spełniać AtHMA3, kolejna pompa metalowa z podgrupy Zn/Cd/Co/Pb, przy czym mechanizm jej działania prawdopodobnie polega na usuwaniu nadmiaru Cd i Pb do wakuoli [8]. Jakkolwiek doniesienia o występowaniu tego białka w tonoplacie pochodzą tylko z badań na drożdżach i niezbędne jest wykazanie obecności AtHMA3 w wakuolach *Arabidopsis*.

Natomiast pompa metalowa AtHMA5 może uczestniczyć w usuwaniu nadmiaru Cu przez zewnętrzną błonę komórkową do apoplastu [23]. Mutanty *Arabidopsis* z wyłączoną ekspresją genu kodującego tę pompę wykazują nadwrażliwość na Cu [23]. Jakkolwiek nie ma dotąd badań, które wskazywałyby na występowanie AtHMA5 w plazmolemie.

Ponieważ dowiedziono udziału P<sub>1B</sub>-ATPaz w detoksykacji komórek roślinnych z nadmiaru metali ciężkich, wydaje się, że białka te mają kluczowe znaczenie dla roślin, które doskonale rosną na glebach zanieczyszczonych metalami. Do takich roślinnych hyperakumulatorów należy *Thlaspi caerulescens*, gatunek gromadzący toksyczne stężenia Zn i Cd w pędach. Wykazano, że pompa metalowa TcHMA4, odpowiednik AtHMA4 u *A. thaliana*, transportuje jony cynku i kadmu. Ponadto, ekspresja genu kodującego pompę jest wzmocniona w obecności tych metali w środowisku [14]. Gen

*TcHMA4* ulega ekspresji tylko w korzeniach *Thlaspi caerulescens*, przy czym poziom syntezy mRNA jest wyższy niż w przypadku genu *AtHMA4* u *Arabidopsis*. Prawdopodobnie metale, transportowane przez pompę *TcHMA4* do naczyń korzenia, przemieszczają się następnie do pędów, gdzie są akumulowane w większych ilościach [14]. Ponieważ nadekspresja *AtHMA4* prowadzi do nagromadzenia Cd i Zn w liściach *Arabidopsis* [21], uważa się, że zarówno *AtHMA4*, jak i *TcHMA4* odpowiadają za daleki transport metali do części nadziemnych rośliny. Z drugiej strony zaobserwowano wzmoczoną ekspresję genu *TcHMA4* w warunkach niedoboru Zn w środowisku [14]. W związku z tym funkcja *TcHMA4* obejmowałaby nie tylko detoksykację komórek z nadmiaru Zn, ale również utrzymywanie homeostazy Zn w pędach, co z kolei umożliwia roślinie reprodukcję w warunkach stresowych [14]. Podobnie jak *Thlaspi caerulescens*, inny hyperakumulator – *Arabidopsis halleri* wykorzystuje pompy metalowe do utrzymania względnej homeostazy metalowej w komórkach. Wykazano, że poziom ekspresji *AtHMA3* jest znacznie wyższy u *A. halleri* niż u *A. thaliana* w warunkach zarówno małej, jak i dużej podaży cynku [5]. Konstytutywnie silna ekspresja tego genu może odpowiadać za tolerancję *A. halleri* na stres spowodowany nadmiarem lub niedoborem Zn w środowisku [14].

Dotychczasowe dowody i przypuszczenia dotyczące specyficzności substratowej roślinnych P<sub>1B</sub>-ATPaz zebrano w tabeli 1.

TABELA 1. Podział wybranych P<sub>1B</sub>-ATPaz u roślin i glonów pod względem transportowanych metali

P <sub>1B</sub> -ATPazy	Transportowane metale
AtHMA5, AtHMA6, AtHMA7, AtHMA8, OsHMA4, OsHMA9, CmHMA2, CrHMA2, CrHMA3, BnRAN1, ZmQ6JAH7, SbQ6JAG2, SbQ6JAG3, HvHMA4, HvHMA5, HvHMA8	Cu <sup>+</sup> /Ag <sup>+</sup>
AtHMA2, AtHMA3, AtHMA4, OsHMA2, OsHMA3, TcHMA4, HvHMA2, HvHMA3	Zn <sup>2+</sup> /Cd <sup>2+</sup> /Pb <sup>2+</sup>
AtHMA1, OsHMA1, CrHMA1, CmHMA1, HvHMA1, HvHMA10, GmO22498	Co <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup> /Cd <sup>2+</sup> /Pb <sup>2+</sup>

Numery dostępu sekwencji w banku genów: dla *Arabidopsis thaliana*: AtHMA4, O64474; AtHMA2, Q9SZW4; AtHMA3, Q9SZW5; AtHMA1, Q5JZZ1; AtHMA5, Q9SH30; AtHMA6, Q9SZC9; AtHMA7, Q9S7J8; AtHMA8, Q7YO51; dla *Oryza sativa*: OsHMA1, PlantsT 64489; OsHMA2, PlantsT 64494, OsHMA3, PlantsT 4499; OsHMA4, PlantsT 64504; OsHMA5, PlantsT 64509; OsHMA6, BAD25508.1; OsHMA7, PlantsT 4519; OsHMA8, PlantsT 64524; OsHMA9 [16]; dla *Thlaspi caerulescens*: TcHMA4, Q70LF4; BnRAN1, 941L1. Numery dostępu dla genów *Glycine max*, *Zea mays* i *Sorghum bicolor* odpowiadają podanym w tabelce. Numery dostępu dla genów *Chlamydomonas reinhardtii* i *Ch. merolae*: CrHMA1\_10220; CrHMA2, C\_650007; CrHMA3, C\_260147; CmHMA1, CMS330C; CmHMA2, CMP215C. Sekwencje zidentyfikowane u *Hordeum vulgare* zamieszczono w [23]

## PODSUMOWANIE

W organizmach roślinnych zidentyfikowano znacznie więcej białek należących do podrodziny P<sub>1B</sub>-ATPaz w porównaniu z drożdżami i komórkami zwierzęcymi, co wskazywałoby, że u roślin białka te pełnią zróżnicowane funkcje występując w różnych kompartmentach komórki, tkankach i organach. Coraz więcej doniesień na temat pierwotnych pomp metalowych u *Arabidopsis* opisuje ich udział w dostarczaniu niezbędnych metali do poszczególnych przedziałów komórkowych czy organów. Z drugiej strony, w pracach na mutantach *Arabidopsis* i transformowanych drożdżach potwierdzono rolę P<sub>1B</sub>-ATPaz w usuwaniu nadmiaru metali do apoplastu lub wakuoli. Jakkolwiek do tej pory nie potrafimy odpowiedzieć na szereg istotnych pytań dotyczących precyzyjnego rozmieszczenia poszczególnych P<sub>1B</sub>-ATPaz w komórkach i tkankach roślinnych, mechanizmów ich regulacji i specyficzności substratowej. Pojawiły się pierwsze doniesienia dotyczące identyfikacji genów kodujących pompy metalowe u roślin jednoliściennych: kukurydzy, soi i jęczmienia. W związku z tym przypuszcza się, że są to białka powszechne i homologicznie funkcjonalne u wszystkich roślin wyższych. Niewątpliwie są to transportery o bardzo istotnym znaczeniu dla życia roślin, ich prawidłowego wzrostu, rozwoju i rozmnażania, przez co badania prowadzone w kierunku ich poznania uległy znacznej intensyfikacji w ostatnich latach. Bardzo efektywnie spełniają swoją rolę u metalofitów, umożliwiając im przeżycie w środowisku skrajnie zanieczyszczonym metalami. Poznanie dokładnych mechanizmów działania i regulacji pomp metalowych u tych roślin może zaowocować w przyszłości wyprodukowaniem specjalnie skonstruowanych genetycznie gatunków, opornych na wysokie stężenia metali bądź akumulujących metale ciężkie w tkankach, a przez to oczyszczających skażone nimi gleby.

## LITERATURA

- [1] ABDEL-GHANY SE, MULLER-MOULE P, NIYOGI KK, PILON M, SHIKANAI T. Two P-Type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* 2005; **17**: 1233–1251.
- [2] ARNESANO F, BANCIL L, BERTINI I, CIOFI-BAFFONI S, MOLteni E, HUFFMAN DL, O'HALLORAN TV. Metalochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res* 2002, **12**: 255–271.
- [3] AXELSEN KB, PALMGREN MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 1998; **46**: 84–101.
- [4] BALANDIN T, CASTRESANA C. AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1852–1857.
- [5] BECHER M, TALKE IN, KRALL L, KRAMER U. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J* 2004; **37**: 251–268.
- [6] COX DW, MOORE SDP. Copper transporting P-type ATPases and Human Disease. *J of Bioenerg and Biomem* 2002; **34**: 333–338.
- [7] EREN E, ARGUELLO JM. *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal-transporting P<sub>1B</sub>-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn<sup>2+</sup> homeostasis. *Plant Physiol* 2004; **136**: 3712–3723.

- [8] GRAVOT A, LIEUTAUT A, VERRERET F, AUROY P, VAVASSEUR A, RICHAUD P. AtHMA3, a plant P(1B)-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett* 2004; **561**: 22–29.
- [9] HALL JL, WILLIAMS LE. Transition metal transporters in plants. *J Exp Biol* 2003; **54**: 2601–2613.
- [10] HIMELBLAU E, AMASINO RM. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during senescence. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 1317–1323.
- [11] HUSSEIN D, HAYDON MJ, WANG Y, WONG E, SHERSON SS, YOUNG J, CAMAKARIS J, HARPER JF, COBBETT CS. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 1327–1339.
- [12] MILLS RF, KRIJGER GC, BACCARINI PJ, HALL JL, WILLIAMS LE. Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J* 2003; **35**: 164–176.
- [13] MILLS RF, FRANCINI A, FERREIRA DA ROCHA PSC, BACCARINI PJ, AYLETT M, KRIJGER GC, WILLIAMS LE. The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Lett* 2004; **579**: 783–791.
- [14] PAPOYAN A, KOCHIAN LW. Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance: Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiol* 2004; **136**: 3814–3823.
- [15] RODRIQUEZ F, ESCH J, HALL A, BINDER B, SCHALLER GE, BLEECKER AB. A copper cofactor for the ETR1 receptor from *Arabidopsis*. *Science* 1999; **283**: 996–998.
- [16] ROSAKIS A, KOSTER W. Transition metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* – genomic sequence analysis. *Res Microbiol* 2004; **155**: 201–210.
- [17] RUTHERFORD JS, BIRD AJ. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* 2004; **3**(1): 1–13.
- [18] SOLIOZ M, VULPE C. CPx-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem* 1996; **21**: 237–241.
- [19] SHIKANAI T, MULLER-MOULE P, MUNEKAGE Y, NIYOGI KK, PILON M. PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis* functions in copper transport in chloroplast. *Plant Cell* 2003; **15**: 1333–1346.
- [20] TOTTEY S, RONDET SAM, BORRELLY GPM, RICH PR, ROBINSON NJ. A copper metallochaperone for photosynthesis and respiration reveals metal-specific targets, interaction with an importer and alternative sites for copper acquisition. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5490–5497.
- [21] VERRERET F, GRAVOT A, AUROY P, LEONHARDT N, DAVID P, NUSSAUME L, VAVASSEUR A, RICHAUD P. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* 2004; **576**: 306–312.
- [22] WILLIAMS LE, PITTMAN JK, HALL JL. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1465**: 104–126.
- [23] WILLIAMS LE, MILLS RF. P1B-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 491–502.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

Otrzymano: 13.06. 2006 r.

Przyjęto: 06.09. 2006 r.

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław,

mmigocka@biol.uni.wroc.pl



## NEURALNE KOMÓRKI MACIERZYSTYCH Z LUDZKIEJ KRWI PEPOWINOWEJ – CHARAKTERYSTYKA IMMUNOCYTOCHEMICZNA, FIZJOLOGICZNA I MOLEKULARNA\*

NEURAL STEM CELLS FROM HUMAN CORD BLOOD –  
IMMUNOCYTOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL  
AND MOLECULAR ANALYSIS

Leonora BUŻAŃSKA

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN,  
Warszawa

*Streszczenie:* Populację komórek macierzystych/progenitorów, mających zdolność do różnicowania się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów wyizolowano z frakcji mononuklearnej ludzkiej krwi pępowinowej, pozbawionej komórek hematopoetycznych (CD 34<sup>+</sup>, CD 45<sup>+</sup>). Ekspansja tej populacji, poprzez wielokrotne pasażowanie komórek nieprzylegających w obecności EGF, umożliwiła otrzymanie stabilnej, klonogennej linii neuralnych komórek macierzystych z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC), bez uprzedniej immortalizacji. Opracowano metody pozwalające na utrzymanie w hodowli linii HUCB-NSC na różnych etapach zaawansowania rozwojowego. Ustalono warunki *in vitro* standaryzowanej hodowli dla HUCB-NSC, w których możemy kierować decyzjami rozwojowymi komórek przy pomocy czynników wzrostowych, mitogenów lub neuromorfenów. Analiza molekularna (mikromacierze DNA) i immunocytochemiczna komórek niezróżnicowanych HUCB-NSC wskazuje na aktywację szlaków komórkowych WNT, DELTA/NOTCH oraz FGFR1. W obecności dBcAMP HUCB-NSC różnicują się głównie w kierunku neuronalnym (do 80%). W komórkach zróżnicowanych wykazano ekspresję zarówno mRNA, jak i białek receptorowych (dopaminergicznych, gabaergicznych, glutamatergicznych, serotonergicznych i cholinergicznych) oraz związanych z przekaźnictwem synaptycznym. Badania elektrofizjologiczne wykazały obecność w komórkach HUCB-NSC typowych dla neuronów prądów potencjało-zależnych i receptorowych. Udowodniono, że HUCB-NSC jest linią neuralnych komórek macierzystych, zdolną do różnicowania w komórki typowe dla OUN. Jest to pierwsze doniesienie dotyczące otrzymania i różnicowania funkcjonalnego w kierunku neuronalnym, nieimmortalizowanej, somatycznej linii komórek macierzystych.

**Słowa kluczowe:** neuralne komórki macierzyste, ludzka krew pępowinowa, różnicowanie neuronalne, mikromacierze DNA, elektrofizjologia.

**Summary:** The population of stem/progenitor cells was selected from human cord blood non-hematopoietic (CD<sup>34</sup> and CD<sup>45</sup> negative) mononuclear fraction and was shown to attain neural features. Due to repeated expansion and selection of these cells in the presence of EGF we have established the first clonogenic, non-immortalized human umbilical cord blood neural stem cell like line (HUCB-NSC). This line can be maintained in culture at different developmental stages and their fate decisions can be experimentally manipulated *in vitro* by the presence of trophic factors, mitogenes and neuromorphogenes. Standardized conditions for their growth and differentiation have been established. The activation of the WNT, DELTA/NOTCH and FGFR1 signaling pathways in HUCB-NSC was shown by molecular and immunocytochemical analysis. Differentiation in the presence of dBcAMP directed HUCB-NSC predominantly (80%) into neuronal lineage, as revealed by DNA microarray and immunocytochemistry. This included expression of several functional proteins: glutamatergic, GABA-ergic, dopamine, serotonin and acetylcholine receptors or synaptic vesicle proteins. That was further confirmed by electrophysiological studies showing in differentiated HUCB-NSC two types of voltage-sensitive and several ligand gated currents typical for neuronal cells. Obtained results confirm the stem character and neural commitment of HUCB-NSC cell line. This is the first report of establishment and functional neuronal differentiation of nonimmortalized somatic stem cell line.

**Key words:** neural stem cells, human cord blood, neuronal differentiation, DNA microarray, electrophysiology.

## WSTĘP

Komórki macierzyste (*Stem Cells*, SC) mają zdolność do samoodnowy przez ciągłe podziały (odpowiednikiem funkcjonalnym jest klonogenność) oraz do różnicowania się w dojrzałe komórki tkanek i narządów. Na określonych etapach rozwoju osobniczego SC wykazują różny stopień ograniczenia potencjału do dalszego różnicowania, począwszy od komórki totipotencjalnej, która może różnicować się we wszystkie pozostałe komórki organizmu (jedynie zapłodniona komórka jajowa i pierwsze komórki potomne), poprzez pluri-, multi- oraz unipotentne.

Zarodkowe komórki macierzyste (*Embryonic Stem Cells*, ESC) mogą namnażać się w hodowli *in vitro* logarytmicznie, w czasie nieograniczonym, zachowując jednocześnie swoją pluripotentność, to jest zdolność do różnicowania się we wszystkie (poza płciowymi) komórki organizmu [1]. Dzięki temu można otrzymać w krótkim czasie dużą ilość komórek do zastosowania w terapii transplantacyjnej. Jednakże linie komórkowe wyprowadzane z ESC wykazują cechy niestabilności genetycznej i epigenetycznej [2], co może być powodem ich skłonności do tworzenia guzów w organizmach otrzymujących przeszczep komórkowy.

Te problemy natury biologicznej, a także zastrzeżenia natury etyczno-moralnej związane ze sposobem otrzymywania ESC skłoniły wielu badaczy do poszukiwania alternatywnych źródeł komórek macierzystych z jednej strony bezpiecznych onkologicznie, z drugiej strony podobnie jak ESC wykazujących zdolność do ekspansji *in vitro*. Specyficzne tkankowo, somatyczne komórki macierzyste (*Somatic Stem Cells*, SSC) są drugim źródłem komórek macierzystych stosowanym w terapii transplanta-

cyjnej i podobnie jak ESC wykazują zdolność do strukturalnej i funkcjonalnej integracji z tkanką biorcy przeszczepu, jednakże mają ograniczoną zdolność do podziałów i ekspansji *in vitro*. Początkowo uważano, że SSC mogą różnicować się jedynie w komórki tkanki, z której pochodzą. Badania ostatnich lat wykazały jednak, że SSC są multipotencjalne nie tylko w obrębie jednej tkanki, ale mogą także przekraczać bariery tkankowe i różnicować się w komórki pochodzące z innych listków zarodkowych. Taka zdolność SSC tłumaczona jest zjawiskiem plastyczności (przeprogramowania – transdyferencjacji populacji już ukierunkowanych tkankowo komórek) i/lub transpotencji (wyjściowego braku zaprogramowania – utrzymania autonomicznego, niezróżnicowanego stanu pluripotencjalności części komórek występujących w określonej niszy tkankowej) [3]. Mechanizmy molekularne tych zjawisk nie są do końca poznane, choć koncepcja „*open transcriptosom*”, która zakłada, że większość genów w komórkach macierzystych jest utrzymywana w tzw. „stanie otwartym”, czyli z aktywacją na niskim poziomie [4], ma coraz więcej zwolenników. Podstawą tej hipotezy było wykrycie, że w niektórych typach somatycznych komórek macierzystych (np. mezenchymalnych) ekspresji podlegają wybrane transkrypty typowe dla różnych listków zarodkowych [5, 6]. Z drugiej strony istnieje coraz więcej dowodów na to, że w dojrzałych tkankach somatycznych znajdują się pluripotencjalne komórki o charakterze ESC, których podziały w warunkach *in vivo* są skutecznie hamowane przez sygnały płynące z otaczającej niszy tkankowej [7, 8]. W sprzyjających warunkach *in vitro*, promujących aktywność proliferacyjną, takie „uśpione” pluripotencjalne komórki macierzyste izolowane z tkanki somatycznej mogłyby podlegać pozytywnej selekcji [9,10,11].

Ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste (również komórki prekursorowe układu nerwowego) zwykle, w hodowli *in vitro*, po pewnej liczbie podziałów nieodwracalnie przestają się dzielić i spontanicznie różnicują się. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest tzw. asymetria podziałów komórek macierzystych pochodzących z tkanek somatycznych [12]. Z pojedynczej komórki tego typu po podziale powstaje jedna komórka macierzysta, która jest kopią komórki matczynej i jedna komórka progenitorowa, czyli komórka macierzysta „ukierunkowana” już w dalszym rozwoju. O podziałach lub dalszej specjalizacji komórki decydują sygnały zarówno pochodzenia wewnątrzkomórkowego, jak i z otaczającego ją środowiska [13, 14, 15]. W niszach mózgu jest to wystarczające do utrzymania stałej puli komórek macierzystych, natomiast *in vitro*, jeśli nie zostaną zapewnione odpowiednie warunki do stymulacji podziałów symetrycznych, przesunięcie kinetyki podziałów komórkowych w stronę podziałów asymetrycznych prowadzi do starzenia się i zamierania hodowli komórkowej. Dlatego problemem wciąż trudnym w przypadku SSC jest opracowanie metody nieograniczonego namnażania tych komórek *in vitro* i możliwość wyprowadzenia, bez uprzedniego unieśmiertelniania, ustalonych linii komórkowych. Takie linie komórkowe są niezwykle potrzebne zarówno dla dalszych badań podstawowych, jak i dla oczekiwanego zastosowania terapeutycznego.

W pracy Bużańska i wsp. [9] dokumentujemy wyprowadzenie stabilnej, nietransformowanej linii neuralnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej. Tym samym dostarczamy dowodów na to, że możliwe jest w warunkach *in vitro* wyselekcjonowanie

somatycznych komórek macierzystych, które mogą namnażać się w sposób nieograniczony (podobnie jak dzielące się symetrycznie embrionalne komórki macierzyste). Podobną stymulację do podziałów symetrycznych w hodowli *in vitro* uzyskano dla somatycznych komórek macierzystych izolowanych z mózgow płodowych szczura i człowieka [10]. Co więcej, Conti i wsp. [10] zastosowali protokół doświadczalny podobny do naszego w kontekście zarówno sposobu izolacji komórek zdolnych do podziałów symetrycznych, jak i metody utrzymywania w hodowli komórek proliferujących.

Ludzkie neuralne komórki macierzyste (*Human Neural Stem Cells* – hNSC) można otrzymywać *in vitro* z hodowli ESC [16, 17] i z mózgowych tkanek somatycznych (płodowych – [18] i dorosłego człowieka – [19]), ale również ze szpiku kostnego [20, 21, 7] i skóry człowieka [22]. Praca podjęta przez nasz Zespół i realizowana od 2000 roku we współpracy z Zakładem Hematologii Doświadczalnej Instytutu Onkologii w Warszawie udowodniła, że źródłem neuralnych komórek macierzystych może być również ludzka krew pępowinowa [23]. Badania te, wówczas pionierskie, zostały przedstawione na Konferencji ISN/ASN (*International Society of Neuroscience/American Society of Neuroscience*) w sierpniu 2001 roku w Buenos Aires [24]. Podobne wyniki równoległe otrzymał zespół pracujący w Tampie (Floryda) [25].

Niniejsza praca stanowi przegląd wyników prezentowanych w cytowanych publikacjach [9, 23, 26, 27, 28] i dotyczy następujących zagadnień:

- otrzymywanie progenitorów neuralnych z ludzkiej krwi pępowinowej i dowody na ich zdolność do wielokierunkowego różnicowania się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów [23];
- wyprowadzenie stabilnie ukierunkowanej linii neuralnych komórek macierzystych (*Human Umbilical Cord Blood – Neural Stem Cells: HUCB-NSC*) z progenitorów pochodzących z krwi pępowinowej [9];
- standaryzacja wzrostu i różnicowania HUCB-NSC: opracowanie metod hodowli *in vitro* umożliwiających utrzymywanie HUCB-NSC na różnych etapach zaawansowania rozwojowego (od niezróżnicowanych, poprzez ukierunkowane progenitory neuralne o zawężonym spektrum rozwojowym, do komórek zróżnicowanych) [26,27];
- analiza molekularna mechanizmów leżących u podstaw utrzymania „macierzystości” wprowadzonej linii HUCB-NSC [9];
- różnicowanie HUCB-NSC w komórki o charakterze funkcjonalnych neuronów: dowody na podstawie badań molekularnych (mikromacierze DNA), immunocytochemicznych (ekspresja białek) oraz elektrofizjologicznych (metoda „*patch clamp*”) [9, 27, 28].

## OTRZYMYWANIE PROGENITORÓW NEURALNYCH Z LUDZKIEJ KRWI PĘPOWINOWEJ

Nasze badania udowodniły, że ludzka krew pępowinowa może być źródłem komórek macierzystych, które pod wpływem odpowiednich warunków środowiska (obecność surowicy i stymulacja neuromorfogেনami) mogą różnicować się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów [23].

Założeniem wyjściowym do przeprowadzanych doświadczeń było uzyskanie frakcji mononuklearnej krwi pępowinowej zawierającej komórki klonogenne o możliwie najniższym stopniu ograniczenia potencjału do różnicowania. W tym celu przeprowadzono immunodeplecję (metodą sortowania magnetycznego) komórek macierzystych już ukierunkowanych hematopoetycznie (CD34+), a następnie przez 6 tygodni stabilizowano hodowlę w obecności 10% surowicy. Otrzymana jednowarstwowo rosnąca hodowla komórek mononuklearnych była CD34(-), CD45(-), tj. negatywna odpowiednio pod względem powierzchniowych markerów hematopoetycznych i endotelialnych. Dalsza selekcja polegała na zmianie warunków hodowli w kierunku stymulacji do podziałów tej części komórek, która jest wrażliwych na czynnik wzrostowy EGF (*Epidermal Growth Factor*). Wcześniejsze prace [19] wykazały, że EGF specyficznie stymuluje do podziałów neuralne komórki macierzyste izolowane z OUN (Ośrodkowego Układu Nerwowego). Wybór do dalszej selekcji i propagacji w hodowli komórek nieprzylegających był również nieprzypadkowy. Założeniem było, że są to komórki niezróżnicowane, wrażliwe na EGF i o dużej zdolności proliferacyjnej. Doprowadziło to do skutecznego wyizolowania frakcji namnażających się komórek o charakterze neuralnych komórek macierzystych. Komórki te wykazywały zdolność do tworzenia klonów, pozytywnych pod względem ekspresji nestyny (zarówno na poziomie białka, jak i RNA) – typowego markera dla neuralnych komórek macierzystych. Co więcej, w obrębie tego samego klonu zidentyfikowano immunocytochemicznie komórki różniące się do trzech różnych fenotypów neuralnych (neuronów, astrocytów i oligodendrocytów), co świadczy o multipotencjalnym charakterze izolowanych komórek. Zastosowanie kwasu retinowego (RA) z BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) lub tylko RA, powoduje różnicowanie wyizolowanej frakcji komórek macierzystych krwi pępowinowej w komórki o charakterze neuronów (35%), astrocytów (30%) i oligodendrocytów (10%). Stymulacja do różnicowania neuralnego jest jeszcze bardziej skuteczna w obecności czynników typowych dla niszy neurogennej w mózgu niż sama obecność badanych czynników wzrostowych. Udowodniono to w doświadczeniach, w których komórki macierzyste z krwi pępowinowej znakowano pochodnymi chlorometylowymi dwuocianu fluoresceiny (*Molecular Probs*) i hodowano w ko-kulturze z komórkami izolowanymi z kory mózgu szczura. Spowodowało to ok. 10% wzrost zdolności do różnicowania zarówno w kierunku neuronalnym, jak i w kierunku astrocytalnym.

## WYPROWADZENIE LINII HUCB-NSC Z PROGENITORÓW POCHODZĄCYCH Z KRWI PĘPOWINOWEJ

Stabilna linia komórkowa neuralnych komórek macierzystych wywodzących się z krwi pępowinowej HUCB-NSC (*Human Umbilical Cord Blood – Neural Stem Cells*) została otrzymana bez uprzedniego unieśmiertelniania komórek [9]. Stało się to możliwe, dzięki zastosowaniu metody hodowli *in vitro* przez selekcję komórek niezróżnicowanych (klonogennych, nieprzylegających) i ich propagację – wielokrotne pasażowanie w obecności mitogennego czynnika wzrostowego EGF, promującego przeżycie komórek ukierunkowanych neuralnie [19]. Ustabilizowanie linii jako neuralnej linii komórek

macierzystych nastąpiło po jej przejściowej hodowli w warunkach bez surowicy w obecności czynników wzrostowych EGF, bFGF (*basic fibroblast growth factor*) i LIF (*leukemia inhibitory factor*). Umożliwiło to jednoczesną selekcję komórek ukierunkowanych neuralnie i ich stymulację do proliferacji. Badania immunocytochemiczne i molekularne wykazały, że komórki tak wyprowadzonej linii, po zastosowaniu neuromorfofenów (np. dBcAMP) [9] lub niektórych czynników wzrostowych (np. CNTF – *ciliary neurotrophic factor*) [27] mogą się różnicować do fenotypów neuralnych w ok. 80% badanej populacji, co potwierdza neutralny charakter tej linii.

Linia HUCB-NSC utrzymywana jest już ponad cztery lata w ciągłej hodowli (60. pasaż). Wykazano, że komórki HUCB-NSC mają prawidłowy ludzki kariotyp (46xy) i są wysoce klonogenne (wydajność 10%), co pozwoliło na otrzymanie klonalnych podlinii. W celu ustalenia, czy linia komórkowa jest stabilna i czy spełnia cechy linii neuralnych komórek macierzystych, porównywano dane dotyczące kinetyki wzrostu, klonogenności, stabilności kariotypu i potencjału do różnicowania pomiędzy wczesnymi (<10) i późnymi (>25, obecnie w pasażu 42.) pasażami linii podczas prawie trzech lat ciągłej hodowli. Wyniki wykazały brak różnic statystycznych pomiędzy porównywanymi pasażami udowadniając, że linia jest stabilna i spełnia cechy linii neuralnych komórek macierzystych. Stabilność kariotypu, brak zwiększonej ekspresji typowych onkogenów (np. *myc*, *ras*), inhibicja kontaktowa w warunkach hodowli konfluentnej, a także brak tworzenia guzów nowotworowych po przeszczepie HUCB-NSC do myszy NOD/SCID (*non-obese diabetic* (NOD)/*severely combined-immunodeficient* (SCID), pozbawionej odporności immunologicznej, pozwalają sądzić, że nie jest to linia transformowana [9 oraz dane niepublikowane].

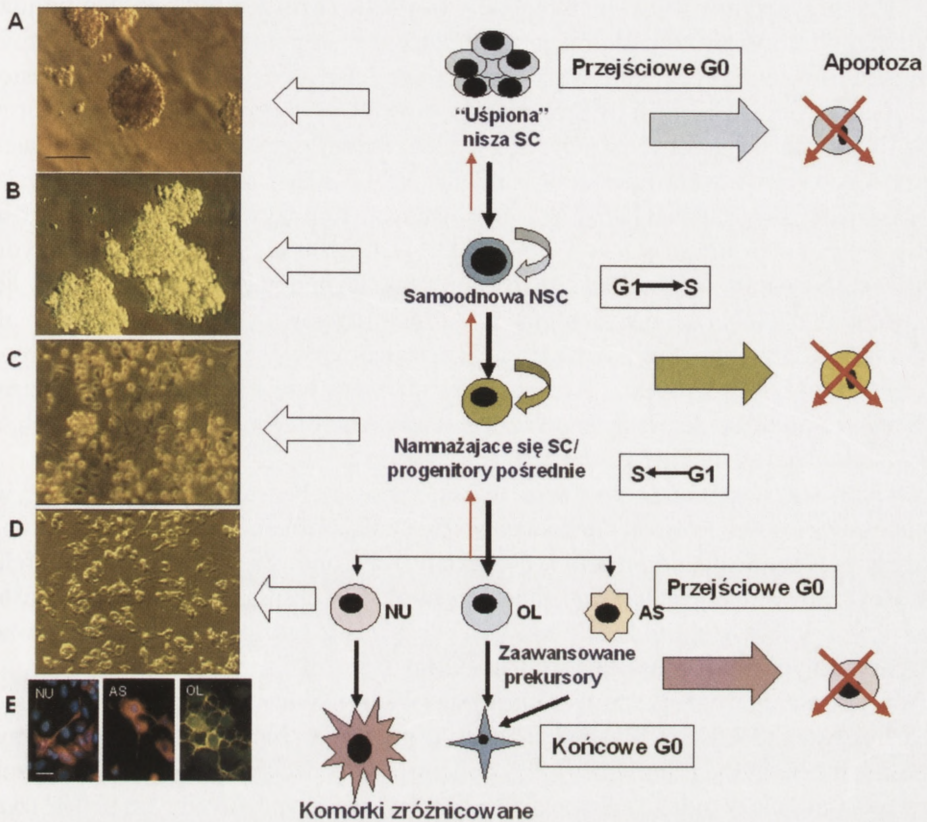
Propagacja hodowli komórek HUCB-NSC prowadzona jest w trzech różnych warunkach:

1) bez surowicy w obecności czynników LIF, EGF i bFGF – hodowla nie zróżnicowanych, nieprzylegających komórek w formie luźno pływających nieregularnych lub typowych regularnych agregatów określanych jako „neurosfer” (ryc. 1 A, B),

2) w pożywce z niską zawartością surowicy (2%), wzbogaconą ITS (*insulin/transferin/selenium*), bez dodatkowych czynników wzrostowych – hodowla mieszana: komórek pływających (niezróżnicowanych) i przylegających do podłoża ukierunkowanych progenitorów oraz (ryc. 1 C),

3) w obecności 10% surowicy z dodatkiem mitogenów EGF i bFGF – hodowla komórek tylko przylegających, ale ciągle proliferujących zaawansowanych progenitorów neuralnych (ryc. 1 D).

Badaliśmy ekspresję określonych białek typowych dla komórek rozwijającego się i dojrzałego OUN w różnych warunkach hodowli, stosując metodę znakowania immunocytochemicznego. W komórkach niezróżnicowanych HUCB-NSC, hodowanych bez surowicy wysokiej ekspresji podlegają białka typowe dla neuralnych komórek macierzystych, takie jak: nestyna (ok. 90%), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, ok. 40%) oraz neurofilament NF-200 (ok. 20%). Struktura włóknista, typowa dla tych białek nie była widoczna. Białka typowe dla komórek zaawansowanych w różnicowaniu neuralnym ( $\beta$ -TUBULINA III, MAP2 – *microtubul associated protein 2* dla neuronów,



RYCINA 1. Stadia rozwojowe HUCB-NSC podczas różnicowania w kierunku linii neuralnych. A–D: kontrast fazowy, wskaźnik powiększenia: 100  $\mu\text{m}$ . A – neurosfery w hodowli niezróżnicowanych HUCB-NSC – nisza utrzymująca komórki w „uśpieniu” (przejściowy stan G0), w środowisku bez surowicy; B – samoodnawiające się, nieadherentne HUCB-NSC stymulowane do podziałów w środowisku bez surowicy z dodatkiem mitogenów (EGF i bFGF); C – hodowla mieszana: komórek pływających (niezróżnicowanych) i przylegających do podłoża ukierunkowanych progenitorów w środowisku z niską zawartością surowicy (2%), bez dodatkowych czynników wzrostowych; D – hodowla komórek tylko przylegających, ale mających zdolność do proliferacji zaawansowanych progenitorów neuralnych (przejściowa faza G0, w obecności 10% surowicy z dodatkiem mitogenów EGF i bFGF); E – immunodetekcja (metoda znakowania ref. [26]):  $\beta$ -TUBULINY III, w komórkach o charakterze neuronów (NU), GFAP w komórkach o charakterze astrocytów (AS) oraz GAL C w komórkach o charakterze oligodendrocytów (OL), niebieskie – jądra barwione Hoechst 33258. Komórki różnicowane przez dwa tygodnie w 2% surowicy z dodatkiem neuromorfenów, nie proliferują, są w końcowej fazie G0. Wskaźnik powiększenia 50  $\mu\text{m}$ . Komórki macierzyste proliferujące lub będące w przejściowej fazie G0 nie wchodzi na ścieżkę apoptozy

S100 $\beta$  dla astrocytów, GAL C – galaktocerebrozyd C dla oligodendrocytów) w warunkach hodowli niezróżnicowanej nie podlegają ekspresji. W komórkach adherentnych, hodowanych w obecności 2% surowicy zarówno ekspresja, jak i organizacja strukturalna tych białek zmieniła się: dla nestyny i GFAP poziom ekspresji spada odpowiednio do 15% i 23% komórek w populacji, w przypadku NF200 zwiększa się do

ok. 30%, przy czym wszystkie te białka, w tej fazie różnicowania, występują już w formie spolimeryzowanej. Wynik ten tłumaczymy stopniowym ukierunkowaniem progenitorów neuralnych, jakimi są komórki przylegające HUCB-NSC. Łączy się to ze stopniową utratą ekspresji wczesnych markerów dla neuralnych komórek macierzystych, do których należą nestyna i GFAP, z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji białek charakterystycznych dla neuronów, takich jak NF-200. Równocześnie we frakcji przylegającej komórek HUCB-NSC, hodowanych w pożywce z niską zawartością surowicy, pojawia się ekspresja  $\beta$ -TUBULINY III, S100 $\beta$  i galaktozy-cerebrozydu – GAL C, co świadczy o stymulacji do różnicowania tej hodowli we wszystkie trzy linie typowe dla OUN. Na uwagę zasługuje pozornie nietypowa ekspresja GFAP – białka charakterystycznego dla zróżnicowanych astrocytów, w niezróżnicowanych, nieadherentnych HUCB-NSC. Badania prowadzone w wielu laboratoriach wykazały, że białko to podlega ekspresji również w neuralnych komórkach macierzystych, ale tylko pochodzenia ludzkiego [30, 10].

HUCB-NSC hodowane w wysokim stężeniu surowicy, bez mitogenów lub w pożywce z małą zawartością surowicy, ale w obecności neuromorfogenów zmieniają fenotyp na bardziej przypominający komórki o charakterze neuronów, astrocytów czy oligodendrocytów zarówno morfologicznie, jak i pod względem ekspresji białek. Świadczy to o znaczącym wpływie warunków hodowli i związaną z tym dostępnością czynników epigenetycznych na różnicowanie HUCB-NSC.

W innej pracy [31] wykazaliśmy również wpływ czynników genetycznych na zdolność do różnicowania HUCB-NSC. Podobnie jak w przypadku ludzkich transformowanych komórek macierzystych linii DEV [32], podejmowanie decyzji rozwojowej o sposobie różnicowania zależy m.in. od ekspresji czynników transkrypcyjnych typu bHLH (*basic helix loop helix*). Różnicowanie w kierunku neuronów komórek linii HUCB-NSC hamowane jest obecnością bądź endogennego, bądź dostarczonego drogą transfekcji czynnika ID1 (inhibującego czynniki proneuralne, takie jak neurogeniny lub neuroD), a rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe białka ID1 (jądro lub cytoplazma) może być wskaźnikiem stanu macierzystości komórek HUCB-NSC.

## STANDARYZACJA WZROSTU I RÓŻNICOWANIA HUCB-NSC

Stabilna linia HUCB-NSC zarówno stanowi łatwo dostępne źródło neuralnych komórek macierzystych, jak również umożliwia standaryzację układów eksperymentalnych do badań *in vitro*. Co więcej, wykazaliśmy [26, 8, 9], że HUCB-NSC mogą być hodowane jako warstwa przylegających do podłoża komórek (ryc. 1 C, D) lub jako przestrzenne, pływające konglomeraty niezróżnicowanych komórek o charakterze neurosfer (ryc. 1 A). „Neurosfer” są to struktury typowe dla hodowli neuralnych komórek macierzystych zarówno somatycznych (izolowanych z mózgu płodu lub mózgu dorosłego osobnika [33]), jak i zarodkowych (wyprowadzanych z blastocysty rozwijającego się zarodka [34]). Zdolność HUCB-NSC do tworzenia „neurosfer” potwierdza neuralny charakter wyprowadzonej przez nas linii komórkowej.



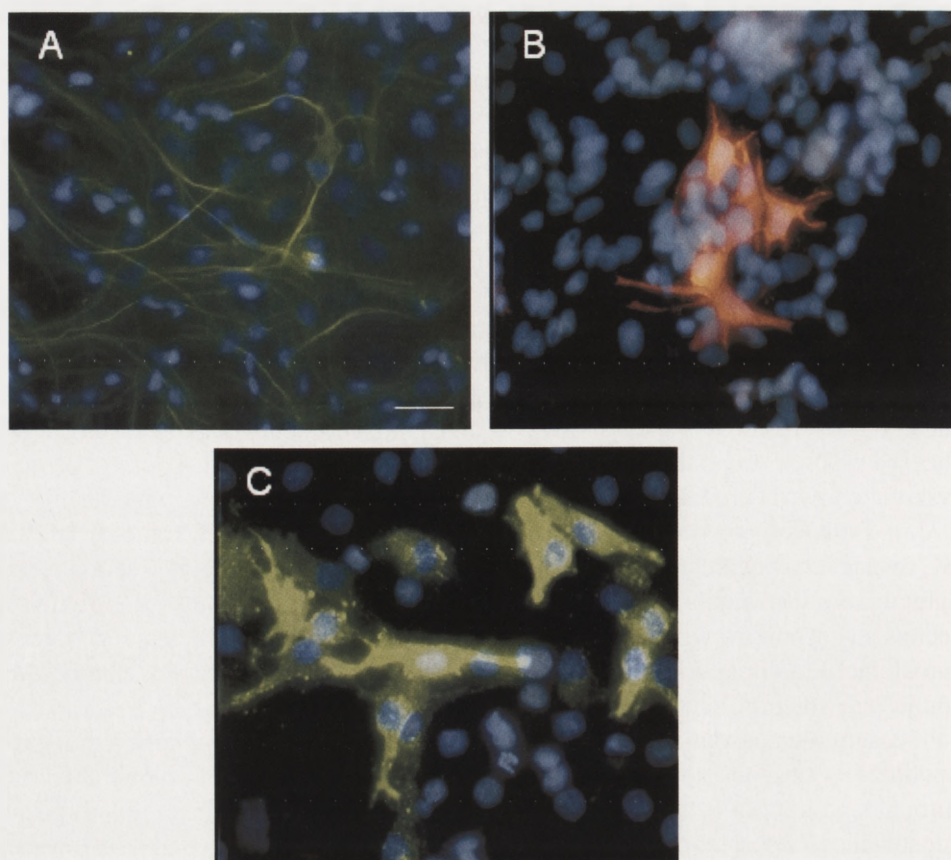
Opracowaliśmy metody umożliwiające utrzymywanie komórek linii HUCB-NSC w hodowli *in vitro*, na różnych etapach rozwoju, które odzwierciedlają hierarchię ich wzrostu i różnicowania: od niezróżnicowanych, poprzez progenitory neuralne o zawężonym spektrum rozwojowym, do komórek zróżnicowanych [26] (ryc. 1). Możliwość izolacji frakcji komórek HUCB-NSC odzwierciedlającej określony etap rozwoju ontogenetycznego neuralnych komórek macierzystych sprawia, że linia HUCB-NSC jest dobrym modelem badań nad neurotoksycznością rozwojową [26, 27].

W pracy Bużańska i wsp. [26], ustaliliśmy optymalne warunki wzrostu i różnicowania HUCB-NSC w długo- i krótkoterminowej hodowli HUCB-NSC. Badania prowadzono w 2-wymiarowej hodowli adherentnej i przestrzennej 3-wymiarowej hodowli reprezentowanej przez neurosfery. W warunkach standaryzowanej hodowli przylegającej, oszacowaliśmy tempo proliferacji i przeżywalność komórek oraz ich zdolność do różnicowania. Wykazaliśmy, że podczas różnicowania spontanicznego indukowanego jedynie adhezją komórek do podłoża (hodowla 2-wymiarowa, adherentna), komórki częściej uzyskują fenotyp neuronalny (ok. 30 %) niż glejowy (astrocyty ok. 10%, oligodendrocyty ok. 2%). Badaliśmy również proliferację i zdolność do różnicowania komórek HUCB-NSC rosnących w neurosferach. Adhezja neurosfer do podłoża stymuluje spontaniczną migrację i różnicowanie komórek HUCB-NSC. Proces ten może być kontrolowany obecnością czynników wzrostowych (np. LIF/CNTF stymuluje proliferację komórek w neurosferach), a także składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (np. fibronektyna hamuje zarówno proliferację, jak i migrację komórek) [26].

Procesem różnicowania HUCB-NSC możemy sterować – w warunkach przylegania do podłoża i w obecności neuromorfogenów podejmowane decyzje rozwojowe dotyczące neuronalnego lub astocytalnego, czy oligodendroglialnego fenotypu zależą od rodzaju zastosowanego neuromorfogenu lub czynnika wzrostowego [27]. Badaliśmy wpływ niektórych czynników wzrostowych i neuromorfogenów (PDGF-AA, PDGF-BB, RA, T3, CNTF, cAMP) stosowanych w 10 różnych kombinacjach w standaryzowanej hodowli na kierunkowe różnicowanie HUCB-NSC w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Wykazaliśmy, że CNTF promuje różnicowanie w kierunku neuronów (ok. 80% komórek  $\beta$ -TUBULINA III pozytywnych) (ryc. 2A), PDGF-BB + RA w kierunku astrocytów (ok. 65% komórek S100 $\beta$  pozytywnych) (ryc. 2B), natomiast PDGF-AA + T3 w kierunku oligodendrocytów (ok. 12% komórek GAL C pozytywnych) (ryc. 2C) [27 oraz dane niepublikowane].

## **ANALIZA MOLEKULARNA MECHANIZMÓW LEŻĄCYCH U PODSTAW UTRZYMANIA „MACIERZYSTOŚCI” WYPROWADZONEJ LINII HUCB-NSC**

Analiza molekularna z zastosowaniem mikromacierzy DNA polegała na badaniu profilu transkrypcyjnego komórek niezróżnicowanych linii HUCB-NSC i różnicowanych pod wpływem dBcAMP (*HUCB-NSC Differentiated* – HUCB-NSCD) oraz populacji referencyjnej komórek mononuklearnych izolowanych z krwi pępowinowej w taki sam



RYCINA 2. HUCB-NSC znakowane immunocytochemicznie przeciwciałami skierowanymi przeciwko  $\beta$ -TUBULINIE III (A), S100 $\beta$  (B), GAL C (C), w komórkach różnicowanych przez 2 tygodnie odpowiednio: w kierunku neuronów (w obecności CNTF), astrocytów (w środowisku z PDGF +RA), oraz oligodendrocytów (w obecności T3). Niebieskie – jądra barwione Hoechst 33258, wskaźnik powiększenia 50  $\mu$ m. Zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego. Szczegóły znakowania w ref. [27]

sposób, w jaki izolowano komórki linii HUCB-NSC (frakcja komórek CD 34<sup>-</sup>, CD 45<sup>-</sup>) – (HUCB-MC) [9].

Porównywaliśmy profil transkrypcyjny niezróżnicowanych komórek HUCB-NSC i wyjściowych – CD 34<sup>-</sup> HUCB-MC. Wykazaliśmy, że 93% genów, określanych jako typowe dla neuralnych, ludzkich komórek macierzystych [35], które są aktywne w HUCB-NSC, nie podlega ekspresji w frakcji referencyjnej komórek mononuklearnych. Świadczy to o neuralnym charakterze linii HUCB-NSC.

Za utrzymywanie „macierzystości”, czyli zdolności do samoodnowy zarówno komórek somatycznych, jak i embrionalnych odpowiedzialna jest aktywacja komórkowych szlaków przekazywania sygnału, takich jak: WNT/ $\beta$ CATENINA [36] oraz LIF/JAK/STAT [37, 35]. Neuralne komórki macierzyste charakteryzują się aktywacją szlaków DELTA/NOTCH oraz FGFR1 [38]. W naszych badaniach, w niezróżnico-

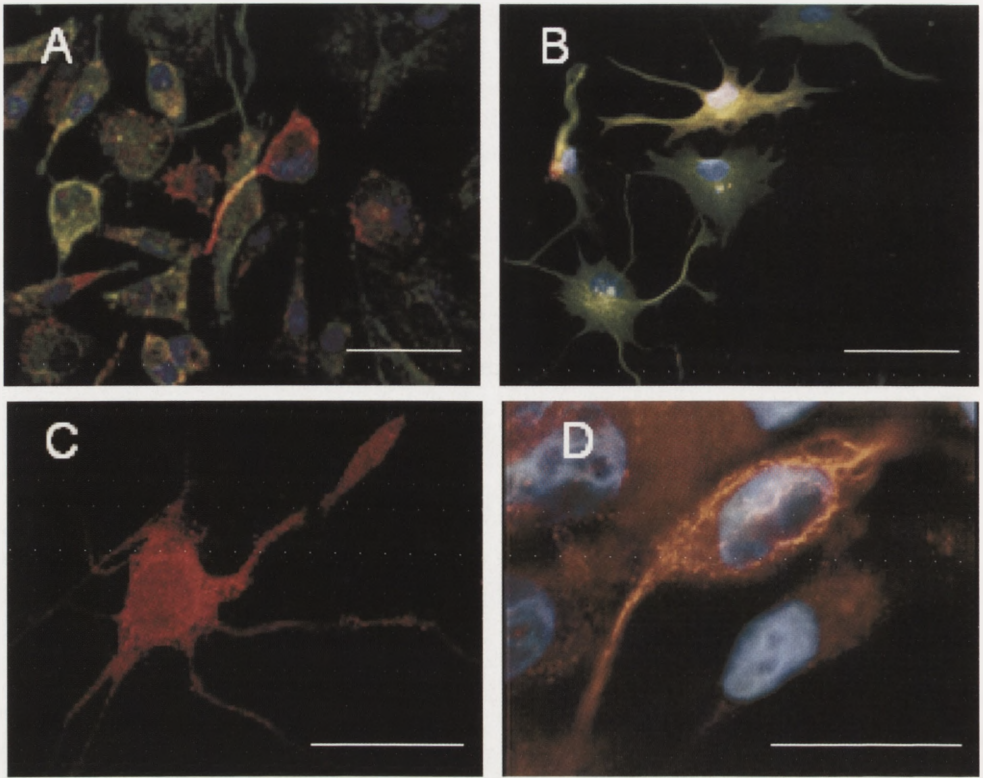
wanych komórkach HUCB-NSC wykazaliśmy wzmożoną aktywność szeregu genów związanych z wymienionymi drogami sygnałowymi. Dla szlaku inicjowanego sygnałem liganda Lif są to geny: *LIFR*, *LIF*, *JAK* oraz *STAT*. Aktywacja drogi WNT koreluje z nadekspresją takich genów, jak: *WNT*, *FRIZZLED*, *LPR*,  $\beta$ -*CATENINA*, *CADHERYNA* i *TCF*, natomiast o aktywacji szlaku DELTA/NOTCH świadczy zwiększona ekspresja *JAGGED2*, *NOTCH3*, *HEY1* oraz *PEN2*. Neuralne ukierunkowanie nieodróżnianej frakcji komórek HUCB-NSC jest związane między innymi ze zwiększoną ekspresją genów dla czynników wzrostowych FGF, PDGF, NRG1 oraz ich receptorów: FGFR1, FGFR3, PDGFR oraz ERBB2. Na szczególną rolę w tym procesie receptora FGFR1 wskazuje aż 600-krotne zwiększenie aktywności tego genu w porównaniu z wyjściową frakcją mononuklearną komórek krwi pępowinowej [9].

## RÓŻNICOWANIE HUCB-NSC W KOMÓRKI O CHARAKTERZE FUNKCJONALNYCH NEURONÓW

Analizę molekularną przy użyciu mikromacierzy DNA zastosowano również do badania ekspresji genów w komórkach różnicowanych w obecności dBcAMP [9]. Różnicowaniu towarzyszy aktywacja genów związanych z receptorami białek G (*GPR17*), a także wzrost ekspresji genów specyficznych dla neuronów, np. *MAPT* (białko Tau), *LXN* (lateksyna), *CALB2* (kalretynina), *GAD 67* (dekarboksylaza kwasu glutaminowego 67), czy też genów kodujących białka zasocjowane z receptorem GABA<sub>A</sub>: *GABARAPL3* i *GABARAPL1*, co sugeruje gabaergiczny charakter różnicowania części komórek HUCB-NSC. Analiza immunocytochemiczna potwierdziła obecność białek kodowanych przez te geny (ryc. 3). Uwagę należy zwrócić również na wzrost ekspresji genów związanych z przekazywaniem synaptycznym: *SV2a* (*synaptic vesicle 2a*), *SYNJ1* (*synaptojanin 1*), *PCL0* (*piccolo*) oraz *NPTX1* (*neuronal pentraxin*) [9].

Badania elektrofizjologiczne [28] prowadzone metodą „*patch clamp*” wykazały w komórkach różnicowanych potencjał spoczynkowy wysokości 50 mV oraz obecność potencjało-zależnych prądów potasowych ( $I_{Kir}$  – *inward rectifying potassium current* oraz  $I_{K+}$  – *outward potassium current*) (ryc. 4 a-e). Prądy te są specyficznie i w sposób odwracalny blokowane przez inhibitory  $I_{Kir}$  i  $I_{K+}$ :  $I_{Kir}$  był inhibowany obecnością jonów  $Cs^+$ ,  $Ba^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ , natomiast  $I_{K+}$  antagonistami kanałów potasowych: TEA (tetraethylammonium) lub 4-AP (4-aminopridine) (ryc. 4 c,e).

Wykazano również aktywność receptorów dopaminergicznych, gabaergicznych, glutamatergicznych i serotonergicznych. W obecności kwasu kainowego, acetylocholinyl (ACH), serotoniny (5-HT), glicyny, GABA i dopaminy (DA)  $I_{Kir}$  w różnicowanych komórkach HUCB-NSC był znacząco modyfikowany. Ekspresja tych receptorów na poziomie białka została potwierdzona immunocytochemicznie. Badania profilu transkrypcyjnego różnicowanych HUCB-NSC przy zastosowaniu mikromacierzy DNA wykazały ekspresję genów dla potencjało-zależnych kanałów potasowych i sodowych, jak również niektórych typów receptorów: dla ACH, GABA, 5-HT, DA, glicyny czy kwasu glutaminowego. Świadczy to o funkcjonalnym różnicowaniu HUCB-NSC w

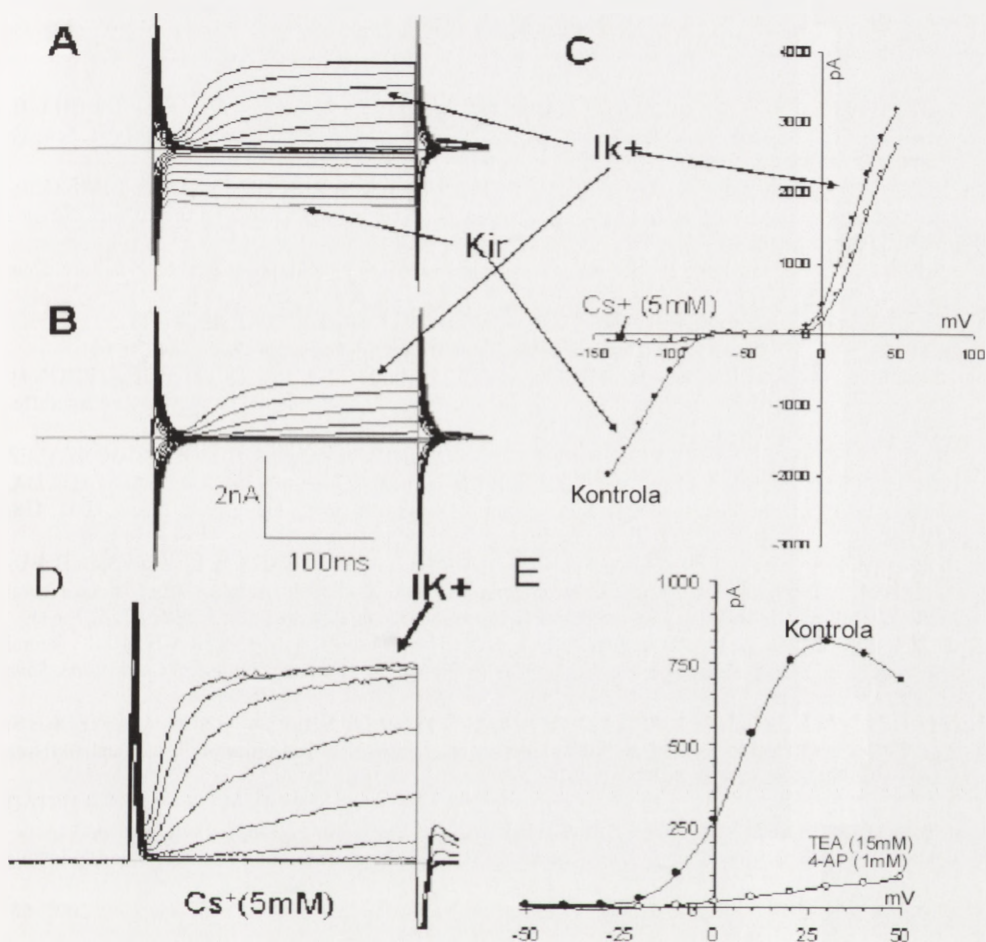


RYCINA 3. HUCB-NSC różnicowane przez 2 tygodnie w obecności dBcAMP. A – koekspresja białka TAU (czerwone) i  $\beta$ -TUB III (zielona), B – koekspresja kalretyniny CALB (czerwona) i  $\beta$ -TUB III (zielona), C – ekspresja dekarboksylazy kwasu glutaminowego 67 (GAD 67), D – ekspresja białka zasocjowanego z receptorem GABAA1. Niebieskie – jądra barwione Hoechst 33258, wskaźnik powiększenia 50  $\mu$ m (A i B), 20  $\mu$ m (C i D). Zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego. Szczegóły znakowania w ref. [9]

komórki o charakterze neuronów. Jednakże brak zapisu potencjałów czynnościowych, jak również brak ekspresji niektórych receptorów (np. NMDA) wskazują na to, że komórki HUCB-NSC różnicowane w obecności dBcAMP mają cechy funkcjonalnego, ale jeszcze niedojrzałego systemu neuronalnego [28, 27]. Obecnie prowadzone badania, w których HUCB-NSC różnicowane są bezpośrednio na powierzchni modyfikowanej do przeprowadzenia pomiarów elektrofizjologicznych (z wbudowanymi elektrodami), wskazują na możliwość uzyskania potencjału czynnościowego w komórkach HUCB-NSC (dane niepublikowane).

## PODSUMOWANIE

Komórki macierzyste wyizolowane z mononuklearnej frakcji ludzkiej krwi pępowinowej można skutecznie różnicować w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Stabilna, nieimmortalizowana linia neuralnych komórek



RYCINA 4. Prądy potencjało-zależne Kir oraz  $I_{K^+}$  indukowane w komórkach HUCB-NSC przez skokowe zmiany potencjału od  $-140$  do  $+50$  mV (skok co  $10$  mV), potencjał spoczynkowy  $+50$  mV. Badania prowadzono metodą „patch clamp” w komórkach różnicowanych przez 2 tygodnie w obecności dBcAMP. Prądy te są specyficznie i w sposób odwracalny blokowane przez inhibitory Kir i  $I_{K^+}$ : Kir był inhibowany obecnością jonów  $Cs^+$ , (B,C,D), natomiast  $I_{K^+}$  antagonistami kanałów potasowych: TEA (tetraethylammonium) lub 4-AP (4-aminopridine) (E). Szczegóły metodyczne ref. [28]

macierzystych HUCB-NSC jest potencjalnym źródłem komórek somatycznych do badań związanych z terapią chorób neurodegeneracyjnych, jest również dobrym modelem do badań nad neurotoksycznością rozwojową.

Przedstawione dowody otrzymania neuralnych komórek macierzystych z ludzkiej krwi pępowinowej i wyprowadzenie stabilnej linii komórkowej HUCB-NSC są pionierskie w dziedzinie badań komórek macierzystych.

## LITERATURA

- [1] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, MICHELLE A, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145.
- [2] HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGER K, RIDEOUT WM3RD, BINISZKIEWICZ D, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001; **293**(5527): 95–97.
- [3] SHERLEY JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem cells* 2002; **20**: 561–572.
- [4] LIU Y, RAO MS. Transdifferentiation – fact or artifact *J Cell Biochem* 2003; **88**: 29–40.
- [5] SONG S, SANCHEZ-RAMOS J. Brain as the sea of marrow. *Exp Neurology* 2003; **184**: 54–60.
- [6] TONDREAU T, LAGNEAUX L, DEJENEFFE M, MASSY M, MORTIER C, DELFORGE A, BRON D. Bone marrow derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004; **72**: 319–326.
- [7] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORITZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE C. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**: 41–49.
- [8] JURGA M, MAKAREWICZ I, SARNOWSKA A, HABICH A, KOZŁOWSKA H, ŁUKOWSKA B, BUŻAŃSKA L, DOMAŃSKA-JANIK K. Neurogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Neural Stem Cells Depends on Previous Long-Term Culture Conditions. *J Neurosci Res* 2006; **83**: 627–631.
- [9] BUŻAŃSKA L, JURGA M, STACHOWIAK EK, STACHOWIAK MK, DOMAŃSKA-JANIK K. Neural Stem-like Cell Line Derived from Nonhematopoietic Population of Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells Dev* 2006; **15**: 391–406.
- [10] CONTI L, POLLARD SM, GORBA T, REITANO E, TOSELLI M, BIELLA G, SUN Y, SANZONE S, YING Q, CATTANO E, SMITH A. Niche-independent symmetrical self-renewal of mammalian tissue stem cell. *PLOS Biol* 2005; **3**: 1–12.
- [11] KUCIA M, ZHANG YP, RECA R, WYSOCZYŃSKI M, MACHALINSKI M, MAJKA M, ST ILDSTAD ST, RATAJCZAK J, SHIELDS CB, RATAJCZAK MZ. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 2006; **20**: 18–28.
- [12] SOMMER N, RAO M. Neural stem cells and regulation of cell number. *Progress in Neurobiol* 2002; **66**: 1–18.
- [13] WURMSER AE, PALMER TD, GAGE FH. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 2004; **304**: 1253–1254.
- [14] HSIEH J, GAGE F. Epigenetic control of neural stem cell fate. *Cur Opin Genet Dev* 2004; **14**: 461–469.
- [15] RAO M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004; **275**: 269–286.
- [16] LENKA N. Derivation and characterization of neural cells from embryonic stem cells using nestin enhancer. *Methods Mol Biol* 2006; **330**: 33–54.
- [17] CARPENTER MK, ROSLER E, RAO MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2003; **5**(1): 79–88.
- [18] VESCOVI A.L., PARATI E.A., GRITTI A., POULIN P., FERRARIO M., WANKE E., FROLICHSTHAL-SCHOELLER P., COVA L., ARCELLANA-PANLILIO M., COLOMBO A., GALLI R. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 1999; **156**: 71–83.
- [19] ROY NS, WANG S, JIANG L, KANG J, BENRAISS A, HARRISON-RESTELLI C, FRASER RA, COULDWELL WT, KAWAGUCHI A, OKANO H, NEDERGAARD M, GOLDMAN SA. *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 2000; **6**(3): 271–277.
- [20] TROPEL P, PLATET N, PLATEL JC, NOEL D, ALBRIEUX M, BENABID AL, BERGER F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006 [Epub ahead of print]

- [21] ALEXRIAN AR. Epigenetic modifiers promote efficient generation of neural-like cells from bone marrow-derived mesenchymal cells grown in neural environment. *J Cell Biochem* 2006 [Epub ahead of print]
- [22] TOMA JG, AKHAVAN M, FERNANDES KJ, BARNABE-HEIDER F, SADIKOT A, KAPLAN DR, MILLER FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; **3**(9): 778–784.
- [23] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2131–2138.
- [24] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, BERDOWSKA P, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood derived neurons, astrocytes and oligodendrocytes. *J Neurochem* 2001; **78**, suppl. 1: 58.
- [25] SANCHEZ-RAMOS JR., SONG S, KAMATH SG., ZIGOVA T, WILLING A, CARDOZO-PELAEZ F, STEDEFORD T, CHOPP M, SANBERG PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001; **171**: 109–115.
- [26] BUŻAŃSKA L, HABICH A, JURGA M, SYPECKA J, DOMAŃSKA-JANIK K. Human Cord Blood-derived Neural Stem Cell Line – Possible Implementation in Studying Neurotoxicity. *Tox in Vitro* 2005; **19**: 991–999.
- [27] BUŻAŃSKA L, JURGA M, DOMAŃSKA-JANIK K. Neuronal differentiation of Human Umbilical Cord Blood Neural Stem-Like Cell Line. *Neurodeg Dis* 2006; **3**: 19–26.
- [28] SUN W, BUŻAŃSKA L, DOMAŃSKA-JANIK K, SALVI RJ, STACHOWIAK MK. Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2005; **23**: 931–945.
- [29] SINGH SK, IAN D, CLARKE ID, HIDE T, DIRKS PD. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; **23**: 7267–7273.
- [30] DOETSCH F. A niche for adult neural stem cells. *Cur Opin Genet Dev* 2003; **13**: 543–550.
- [31] JURGA M, BUŻAŃSKA L, HABICH A, MAŁECKI M, DOMAŃSKA-JANIK K. Function of ID1 protein in human cord blood – derived neural stem-like cells. *J Neurosci Res* 2006 (proofs).
- [32] BUŻAŃSKA L, SPASSKY N, BELIN MF, GIANGRANDE A, GUILLEMOT F, KLAMBT C, LABOUESSE M, THOMAS JL, DOMAŃSKA-JANIK K, ZALC B. Human medulloblastoma cell line DEV is a potent tool to screen for factors influencing differentiation of neural stem cells. *J Neurosci Res* 2001; **65**: 17–23.
- [33] SVENDSEN CN, CALDWELL MA, OSTENFELD T. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* 1999; **9**: 499–513.
- [34] O'SHEA KS. Neural differentiation of embryonic stem cells. W: T. Zigowa, P.R. Sandberg, J.R. Sanchez-Ramos [red.] Neural stem Cells: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 2002; **198**: 3–14.
- [35] WRIGHT LS, LI J, CALDWELL MA, WALLACE K, JOHNSON JA, SVENDSEN CN. Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem* 2003; **86**: 179–195.
- [36] SATO N, MEIJER L, SKALTSOUNIS L. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Med* 2004; **10**: 55–63.
- [37] OGAWA K, NISHINAKAMURA R, IWAMATSU Y, SHIMOSATO D, NIWA H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Apr 28; **343**(1):159–166.
- [38] D'AMOUR KA, GAGE FH. Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **30**: 11866–11872.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 05.07. 2006 r.

Przyjęto: 07.09. 2006 r.

ul Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa,

e-mail: buzanska@cmdik.pan.pl, leonora.buzanska@jrc.it





## **ROLA METALOPROTEINAZ MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ W NOWOTWORACH PIERSI, ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ROLI ŻELATYNAZY A ORAZ ŻELATYNAZY B**

**THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES  
IN BREAST CANCER, WITH PARTICULAR  
ROLE OF GELATINASE A AND GELATINASE B**

**Anna ŁAPKA, Anna GOŹDZIALSKA, Jerzy JAŚKIEWICZ**

**Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki  
Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków**

*Streszczenie:* Metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMPs) są enzymami bezpośrednio zaangażowanymi w procesy tworzenia przerzutów nowotworowych. W warunkach fizjologicznych MMPs uczestniczą w takich procesach, jak: embriogeneza, angiogeneza, cykliczne zmiany w endometrium, gojenie ran oraz agregacja płytek. Zmiany aktywności tych enzymów obserwowano w wielu procesach patologicznych, takich jak: choroba nowotworowa, procesy zapalne oraz choroby degeneracyjne układu nerwowego. W procesach nowotworowych MMPs uczestniczą w regulacji wzrostu i proliferacji komórek, tworzeniu przerzutów, angiogenezie oraz w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Szczególnie ważną rolę odgrywają żelatynaza A (MMP-2) oraz żelatynaza B (MMP-9). Są to enzymy mające największą zdolność do degradacji kolagenu typu IV będącego głównym składnikiem błony podstawnej (BM). Utrata ciągłości w strukturze BM warunkuje zapoczątkowanie procesu migracji komórek nowotworowych z pierwotnego guza i tworzenie przerzutów w miejscach odległych.

*Słowa kluczowe:* metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, żelatynaza A, żelatynaza B, nowotwór piersi.

*Summary:* Matrix metalloproteinases (MMPs) are the enzymes which are directly involved in metastasis. Under physiological conditions MMPs are involved in such processes as embryogenesis, angiogenesis, cyclic changes in endometrium, wound healing and platelet aggregation. There is evidence that MMPs activity changes in many pathological conditions, including tumor disease, inflammatory and the degenerative diseases of nervous system. In cancer MMPs regulate growth and cancer-cell proliferation, metastasis, angiogenesis and the immune response to cancer. Gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) play an important role in cancer, because of their ability to degrade type IV collagen. The collagen type IV is the major component of basement membrane (BM). Loss of the continuity in BM structure determines the beginning of the cancer cell migration from primary tumor and creation of remote metastasis.

*Key words:* matrix metalloproteinases, gelatinase A, gelatinase B, breast cancer.

## WSTĘP

Rak gruczołu piersiowego jest obecnie najczęściej występującym nowotworem u kobiet. W Stanach Zjednoczonych oraz krajach Unii Europejskiej rocznie na raka piersi zapada 6–7 proc. kobiet. W Polsce nowotwór ten stanowi około 19 proc. ogółu rejestrowanych nowotworów złośliwych u kobiet i zajmuje pierwsze miejsce pod względem zachorowalności oraz umieralności z powodu nowotworów [45].

Diagnoza zmian nowotworowych opiera się głównie na zastosowaniu metod histopatologicznych i obrazowych. Inną jeszcze metodą wykrywania zmian nowotworowych jest oznaczanie markerów nowotworowych w krwi [14, 21]. Ze względu na fakt, że rozwój choroby nowotworowej poprzedza mutacja określonych genów, poszukuje się obecnie metod, które pozwoliłyby na wykrycie komórek transformowanych nowotworowo. Innym jeszcze kierunkiem badań mogą być oznaczenia stabilności macierzy tkanek, w których rozwijają się zmiany nowotworowe. Wszystkie te działania prowadzą do wykrycia przedprzerzutowego stadium zmian nowotworowych. Wczesne wykrywanie komórek transformowanych nowotworowo umożliwia wdrożenie takich metod terapeutycznych, które zwiększają prawdopodobieństwo wyleczenia lub wydłużają czas przeżycia [16, 39].

Rak piersi charakteryzuje się dużą inwazyjnością poprzez wczesną migrację komórek nowotworowych drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych. Ogniska przerzutów najczęściej wykrywane są w płucach, kościach, wątrobie oraz mózgu [23, 34]. Nabycie przez komórkę nowotworową fenotypu inwazyjnego warunkuje inicjację procesu migracji do otaczających tkanek, a tym samym możliwość tworzenia przerzutów. Aktywacja tego procesu zależy od przebiegających równolegle dwóch procesów, a mianowicie utraty połączeń pomiędzy komórkami guza i degradacji białek macierzy pozakomórkowej (ECM – *extracellular matrix*) [13, 21, 35].

Pierwszym etapem procesu migracji jest pokonanie bariery, jaką stanowi macierz pozakomórkowa oraz błona podstawna (BM – *basement membrane*) [8, 14].

W warunkach fizjologicznych macierz pozakomórkową tworzą specyficzne białka. Wśród tych związków wyróżnia się białka kolagenowe oraz elastynę, a także specyficzne glikoproteiny, proteoglikany i glikozaminoglikany [8]. Skład i proporcje tych związków są charakterystyczne dla poszczególnych tkanek oraz wyznaczają ich strukturę i funkcję. Kolageny oraz elastyna tworzą rusztowanie ECM, zapewniając tym samym zachowanie prawidłowej struktury tkanki oraz transdukcję sygnałów międzykomórkowych [30, 31, 42]. Błona podstawna, będąca jedną z form ECM, utworzona jest głównie przez białko kolagenowe typu IV, fibronektynę, lamininę, entaktynę oraz siarczan heparanu [7, 30]. Glikoproteiny biorą udział w adhezji, migracji oraz różnicowaniu się komórek poprzez wiązanie z integrynami. Proteoglikany występujące w ECM ułatwiają migrację komórek [8].

Zaburzenie funkcji macierzy pozakomórkowej oraz błony podstawnej poprzez patogenne działanie metaloproteinaz jest procesem warunkującym tworzenie przerzutów. Równolegle w zmienionej nowotworowo tkance zachodzi aktywnie proces angiogenezy. Destrukcja macierzy tkankowej oraz angiogeneza to etapy rozwoju zmian nowotworowych umożliwiające migrację komórek z następowym tworzeniem przerzutów [21].

## 1. CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA ORAZ BUDOWA METALOPROTEINAZ

Enzymy hydrolizujące białka macierzy są zaliczane do klasy endopeptydaz. W piśmiennictwie bywają określane jako proteinazy lub proteazy. Obecna klasyfikacja metaloproteinaz wyszczególnia 25 odrębnych enzymów, a z grupy tej 22 występuje u ludzi [8, 38]. Enzymy te ze względu na specyfikę substratową oraz budowę zostały podzielone na 8 grup, a mianowicie: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny, matrylizyny, enamelizyny, metaloelastazy, metaloproteinazy błonowe oraz pozostałe, niezaklasyfikowane do żadnej z wyżej wymienionych grup (tab. 1). W tabeli podano także poznane substraty dla poszczególnych grup enzymów. Substratami są białka macierzy pozakomórkowej, w tym białka kolagenowe, laminina, fibronektyna, elastyna oraz proteoglikany [8, 34]. Podobieństwo enzymów o tej samej specyficy substratowej potwierdzone jest homologią domen tych enzymów [38].

Synteza MMPs w warunkach prawidłowych zachodzi w komórkach macierzy współtworzącej określoną tkankę łączną, w tym również w komórkach krwi. W warunkach patogennych MMPs są ponadto syntetyzowane przez komórki nowotworowe. We wszystkich przypadkach MMPs produkowane są jako preproenzymy, a większość z nich wydzielana jest do ECM w postaci nieczynnych proenzymów. Istnieje możliwość wewnątrzkomórkowej aktywacji MMPs, jak ma to miejsce w przypadku MMP-14, której proces aktywacji zachodzi w aparacie Golgiego [8, 10, 38]. Funkcja aktywnych form MMPs zależy od pH i jest największa w pH obojętnym. Aktywność przemian uczynniania zależy także od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$  [8, 10, 26].

## 2. FUNKCJA METALOPROTEINAZ W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH

W warunkach prawidłowych metaloproteinazy biorą udział w regulacji rozwoju płodowego oraz procesach wzrostu i przebudowy tkanek. Odpowiedzialne są także za cykliczne zmiany w endometrium oraz zmiany zachodzące podczas ciąży, porodu i połogu [38]. Uczestniczą w procesach angiogenezy, a także migracji komórek odpowiedzi zapalnej biorąc udział w procesach gojenia ran oraz tworzenia blizn [33, 38]. MMP-2 odgrywa istotną rolę w regulacji czynności płytek krwi poprzez stymulację agregacji niezależną od tromboksanu  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ). Natomiast MMP-9 hamuje proagregacyjne działanie MMP-2. Antagonistyczne działanie MMP-2 i MMP-9 stanowi jeden z mechanizmów pozwalających na utrzymanie hemostazy naczyniowej [33].

### 2a. Budowa i charakterystyka MMP-2 oraz MMP-9

Metaloproteinaza MMP-2, zwana żelatynazą A lub kolagenazą 72 kDa oraz MMP-9, określana też jako żelatynaza B lub kolagenaza 92 kDa, mają domeny wspólne dla całej grupy MMPs, a także domeny charakterystyczne, stanowiące o ich odmiennych

TABELA 1. Specyfika substratowa metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej [7]

Grupa enzymów	MMP	Substraty
Kolagenazy		
Kolagenaza 1	MMP-1	kolagen typu I, II, III, VII, VIII, X, XI, żelatyna, agrekan, entaktyna, fibronektyna, laminina, tenascyna, vitronektyna, $\alpha 1$ -antychymotrypsyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-2, pro-MMP-9, pro-TNF $\alpha$
Kolagenaza 2	MMP-8	kolagen typu I, II, III, agrekan, $\alpha 2$ -makroglobulina, fibrynogen
Kolagenaza 3	MMP-13	kolagen typu I, II, III, IV, VI, IX, XIV, żelatyna, agrekan, fibronektyna, tenascyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, kazeina, czynnik XII, fibrynogen, pro-MMP-9
Kolagenaza 4	MMP-18	kolagen typu I, żelatyna
Żelatynazy		
Żelatynaza A	MMP-2	kolagen typu I, II, III, IV, VII, IX, X, XI, żelatyna, agrekan, elastyna, entaktyna, fibronektyna, IGFBP, laminina, tenascyna, vitronektyna, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-9, pro-MMP-13, plazminogen, pro-TNF $\alpha$
Żelatynaza B	MMP-9	kolagen typu IV, V, XI, XIV, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, IGFBP, laminina, vitronektyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, endotelina, kazeina, fibryna, fibrynogen, IL1 $\beta$ , pro-MMP-2, plazminogen, pro-TNF $\alpha$
Stromielizyny		
Stromielizyna 1	MMP-3	kolagen typu III, IV, V, VII, IX, X, XI, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibronektyna, IGFBP, laminina, osteonektyna, perlekan, tenascyna, vitronektyna, $\alpha 1$ -antychymotrypsyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, kazeina, E-kadheryna, fibrynogen, fibrynogen, IL-1 $\beta$ , pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13, pro-TNF $\alpha$
Stromielizyna 2	MMP-10	kolagen typu III, IV, V, żelatyna, agrekan, elastyna, fibronektyna, kazeina, fibrynogen, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9
Stromielizyna 3	MMP-11	IGFBP, $\alpha 2$ -makroglobulina
Matrylizyny		
Matrylizyna	MMP-7	kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibronektyna, laminina, tenascyna, vitronektyna, kazeina, E-kadheryna, fibrynogen, pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-9, plazminogen, pro-TNF $\alpha$
Matrylizyna 2	MMP-26	kolagen typu IV, żelatyna, fibrynogen, fibronektyna, vitronektyna, kazeina, pro-MMP-9
Enamelizyna	MMP-20	agrekan
Metaloelastaza	MMP-12	kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, elastyna, entaktyna, fibronektyna, laminina, vitronektyna, czynnik XII, $\alpha 2$ -makroglobulina, fibrynogen, IgG, plazminogen, pro-TNF $\alpha$
Metaloproteinazy błonowe		
MT1-MMP	MMP-14	kolagen typu I, II, III, żelatyna, agrekan, entaktyna, fibronektyna, perlekan, vitronektyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, CD44, czynnik XII, fibryna, fibrynogen, $\alpha v$ integryna, pro-MMP-2, pro-MMP-13, tenascyna, pro-TNF $\alpha$
MT2-MMP	MMP-15	agrekan, entaktyna, fibronektyna, laminina, perlekan, tenascyna, pro-MMP-2
MT3-MMP	MMP-16	kolagen typu III, żelatyna, kazeina, fibronektyna, pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	żelatyna, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-2, pro-TNF $\alpha$
MT5-MMP	MMP-24	żelatyna, fibronektyna, pro-MMP-2
MT6-MMP	MMP-25	kolagen typu IV, żelatyna, fibronektyna, fibrynogen, fibryna, pro-MMP-2

właściwościach. W obrębie domeny katalitycznej MMP-2 i MMP-9 występują trzy powtórzone fragmenty podobne do fibronektyny. Fragmenty te odpowiedzialne są za wiązanie z substratem, jakim jest kolagen i elastyna oraz innymi substratami, które zostały zestawione w tabeli 1 [1, 9, 36]. Ponadto MMP-9 w obrębie regionu zawiasowego ma domenę kolagenu typu V o niepoznanej dotychczas funkcji [8, 38].

W cząsteczce MMPs występuje sekwencja sygnałowa, a także domena katalityczna z centrum aktywnym oraz domena hemopeksynopodobna zakończona grupą karboksylową [8, 31]. Sekwencję sygnałową tworzą aminokwasy N-końca cząsteczki, które decydują o sekrecji proenzymu z siateczki endoplazmatycznej do macierzy zewnątrzkomórkowej. Propeptyd zbudowany jest z sekwencji PRCG(X)PDV (Pro- Arg- Cys- Gly- (X)- Pro- Asp- Val) i zawiera ok. 80 aminokwasów [24]. Wśród aminokwasów szczególną rolę odgrywa cysteina, której reszta wiążąc atom cynku utrzymuje tym samym enzym w stanie nieaktywnym. Domena katalityczna, zbudowana z ok. 170 aminokwasów, zawiera centrum aktywne, o tylko częściowo poznanej sekwencji HEXXHXXGXXH [24, 38]. Trzy cząsteczki histydyny, obecne w domenie katalitycznej wiążą atom cynku [8, 24]. Równoczesne wiązanie atomu cynku przez reszty histydyny z domeny katalitycznej i resztę cysteiny z sekwencji sygnałowej czyni kompleks białkowy nieaktywnym. Rozerwanie połączenia cysteiny z sekwencją sygnałową jest wstępnym procesem prowadzącym do uaktywnienia enzymu.

### 3. REGULACJA AKTYWACJI I INHIBICJI MMP-2 ORAZ MMP-9

Prawidłowa ekspresja MMPs regulowana jest na poziomie transkrypcji genów, translacji, aktywacji proenzymów oraz poprzez aktywatory i inhibitory tkankowe (TIMPs – *tissue inhibitors of metalloproteinases*) [8, 27, 36, 38]. W warunkach patologicznych wzrost ekspresji metaloproteinaz jest spowodowany głównie zaburzeniami regulacji transkrypcji. Pierwszym etapem tych przemian jest zmiana funkcji protoonkogenów w onkogeny. Szczególna rola przypada na protoonkogeny fos i jun. Mutacja w obrębie tych genów często prowadzi do wystąpienia nowotworów [21, 22]. Białka Fos i Jun łączą się w czynnik transkrypcyjny AP-1. Czynniki te ma zdolność tworzenia połączeń z promotorami genów MMP-2 oraz MMP-9, a także wielu innych MMPs [15, 27, 38]. W regulacji poziomu ekspresji MMP-2 bierze także udział onkogen HER2/neu (zwany również c-erbB-2) oraz czynnik transkrypcyjny AP-2 [17, 22].

Onkogen HER-2/neu jest genem kodującym błonowy receptor dla kinazy tyrozynowej, zawierający sekwencje homologiczne z receptorem dla epidermalnego czynnika wzrostu (EGF – *epidermal growth factor*) [17, 22]. Białko HER-2/neu ma aktywność kinazy tyrozynowej, co powoduje pobudzenie sygnału mediowanego receptorem nawet przy braku ligandu. Nadekspresja tego białka obserwowana jest u 20–30% kobiet chorych na nowotwory piersi i najczęściej wynika z amplifikacji genu HER-2/neu [5, 17, 22]. Nadmierna ekspresja genu HER-2/neu, która została potwierdzona w nowotworach gruczołu sutkowego prowadzi do wzrostu aktywności MMP-2.

Czynnik transkrypcyjny AP-2 jest białkiem, którego znaczenie zostało potwierdzone w procesach wzrostu, różnicowania oraz apoptozy komórek [22, 40]. Odgrywa zasadniczą rolę w procesach nowotworowych. Wiąże się z regionem promotorowym protoonkogenu *HER-2/neu* aktywując jego ekspresję [22]. Dodatkowo czynnik transkrypcyjny AP-2 odgrywa znaczną rolę w procesie transkrypcji *MMP-2* oraz odpowiada za zwiększenie aktywności obszaru promotorowego genu *MMP-9*. Efekt wpływu nadekspresji genu *HER2/neu* na zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów jest zatem związany ze zwiększeniem poziomu ekspresji *MMP-2* oraz *MMP-9*, a także ze wzrostem aktywności proteolitycznej tych enzymów [16, 27].

Wzrost poziomu ekspresji MMPs może być także wynikiem spadku poziomu ekspresji genów supresorowych, których produkty białkowe, w prawidłowych warunkach, hamują wzrost i proliferację komórek. Najczęściej występującą mutacją genów supresorowych w raku piersi jest mutacja genu *p53*. Jest to gen, którego białkowy produkt, wiążąc się z DNA kontroluje proces syntezy DNA, transkrypcji oraz apoptozę. W dziedzicznych nowotworach piersi najczęściej obserwowanymi mutacjami są mutacje genów *BRCA-1* i *BRCA-2*. Białka kodowane przez geny *BRCA-1* i *BRCA-2* są białkami jądrowymi. Ich funkcja nie została dokładnie poznana, natomiast prawdopodobnie biorą udział w procesach naprawy DNA i regulacji transkrypcji. Mutacja genu kodującego E-kadherynę powodująca spadek ekspresji tego białka prowadzi do zmniejszenia kohezji międzykomórkowej. Ułatwia to inwazyjność oraz tworzenie przerzutów w nowotworach piersi, raku jelita grubego, przełyku, jajnika [21, 37]. Mutacje genów kodujących poszczególne enzymy są rzadko wykrywane [8, 32, 38].

Ekspresja genów MMPs regulowana jest przez wiele czynników stymulujących oraz hamujących. Do czynników stymulujących ekspresję należą między innymi estry forbolu, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, stres komórkowy oraz cytokiny [8, 20, 38]. Czynniki wzrostu, w tym interleukiny, interferon, EGF, FGF, VEGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  to również ważne regulatory ekspresji MMPs [13, 28, 36]. Innym jeszcze czynnikiem pobudzającym MMPs są białka komórek nowotworowych. Przykładem jest cząsteczka białka EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*), glikoproteina, zlokalizowana na powierzchni komórki nowotworowej [2, 24]. Białko to stymuluje znajdujące się w bliskim sąsiedztwie fibroblasty do produkcji metaloproteinaz, w tym *MMP-2*. Poprzez aktywację *MMP-2* białko EMMPRIN pobudza proteolizę ECM. Obecność EMMPRIN została stwierdzona na powierzchni komórek nowotworowych guzów piersi, płuc, przewodu pokarmowego, pęcherza moczowego, a także komórek czerniaka [24].

*MMP-2* oraz *MMP-9*, tak jak pozostałe enzymy tej grupy, wydzielane są do środowiska pozakomórkowego w postaci nieaktywnego biologicznie proenzymu (pro-MMPs). Aktywacja pro-MMPs do aktywnej MMPs zachodzi w środowisku zewnątrzkomórkowym, ale związana jest z funkcją komórki [10, 29]. Do pełnej aktywacji latentnej formy enzymów konieczny jest proces proteolityczny, tzw. *cysteine-switch*. Efektem jest odcięcie N-terminalnego propeptydu bogatego w cysteinę, a w następstwie odsłonięte zostaje centrum aktywne z trzema resztami histydyny oraz jonem cynku ( $Zn^{2+}$ ) [1, 40]. Mechanizm aktywacji zachodzi poprzez rozerwanie wiązań pomiędzy grupą tiolową cysteiny a jonem cynku [38]. Odłączenie propeptydu maskującego miejsce

aktywne zawierające  $Zn^{2+}$  powoduje skrócenie łańcucha aminokwasowego oraz zmniejszenie masy cząsteczkowej o ok. 10 kDa [10, 38].

Efektywna aktywacja pro-MMP-2 może nastąpić w drodze zależnej od MMP-14 (MT1-MMP) oraz niezależnie od działania tego enzymu. MMP-14 to metaloproteinaza transbłonowa, której cząsteczka jest związana z błoną komórkową komórek tkanki łącznej. Aktywacja MMP-2 poprzez szlak zależny od MMP-14 wymaga powstania kompleksu tego enzymu z MMP-14 i TIMP-2 na powierzchni błony komórkowej [24, 40]. Działanie MMP-14 polega na rozerwaniu wiązania pomiędzy  $Asn^{37}$ - $Leu^{38}$  w cząsteczce pro-MMP-2. Dalsze przekształcenie polegające na rozerwaniu wiązania pomiędzy  $Asn^{80}$ - $Tyr^{81}$  jest procesem autokatalitycznym. Proces aktywacji MMP-2 może także zachodzić wskutek interakcji pomiędzy metaloproteinazą błonową MMP-14 oraz integryną  $\alpha\beta 3$ . Cząsteczki integryny obecne są w komórkach śródbłonna oraz w komórkach nowotworowych różnych tkanek, w tym także w tkankach nowotworowych piersi. Integryna  $\alpha\beta 3$  odgrywa krytyczną rolę w procesach wzrostu nowotworu i tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Interakcja pomiędzy hemopeksy-nopodobną, C-końcową domeną MMP-2 a integryną  $\alpha\beta 3$  umożliwia efektywne dojrzewanie MMP-2. Sama integryna zatem aktywuje MMPs, lecz w połączeniu z vitronektyną specyficznie wiążąca się z integryną, blokuje proces aktywacji proMMP-2, prowadząc tym samym do spadku poziomu aktywnych form MMP-2 [4].

Kolejny mechanizm aktywacji metaloproteinaz może dokonywać się pod wpływem proteinaz serynowych, obecnych w środowisku pozakomórkowym, takich jak: trypsyna, proteinazy systemu aktywacji plazminogenu do plazminy, elastaza leukocytarna oraz katepsyna G. Trypsyna w takich warunkach wydzielana jest przez komórki nowotworowe [33]. Aktywacja dokonuje się także przy udziale aktywnych form metaloproteinaz [38]. Zwiększenie ekspresji oraz aktywacji MMPs w procesach nowotworowych prowadzi do zwielokrotnienia efektu destrukcji macierzy, a zatem widoczny jest tu typowy mechanizm reakcji kaskadowej.

W wyniku działania związków nieorganicznych, takich jak cyjanek lub jodek potasu, siarczan dodecyłu sodu oraz związków organicznych zawierających rtęć, a także mocznika i stresu oksydacyjnego, będących niespecyficznymi aktywatorami MMPs zachodzą zmiany konformacyjne w obrębie cząsteczki pro-MMP. Zmiany te prowadzą w efekcie do odłączenia peptydu regulatorowego i aktywacji proenzymu [10, 33].

W warunkach prawidłowych głównymi inhibitorami metaloproteinaz są tkankowe inhibitory metaloproteinaz TIMP, stanowiące grupę specyficznych inhibitorów MMPs. Są to białka o masie cząsteczkowej pomiędzy 20–29 kDa, które łączą się wiązaniami niekowalencyjnymi z MMP w stosunku stechiometrycznym 1:1 [3, 36, 38, 41]. Kompleks taki może ulec dysocjacji z odzyskaniem pełnej aktywności TIMPs oraz MMPs [9]. Dotychczas poznano i scharakteryzowano cztery geny, które kodują białka TIMP-1, 2, 3 oraz 4. Skład i sekwencja aminokwasowa wszystkich TIMPs jest podobna w 37–51%. Wszystkie zawierają w swej strukturze 12 reszt cysteinowych, które tworzą 6 mostków disiarczkowych oraz 6 pętli polipeptydowych [10, 19, 38]. Pętli 1–3 znajdują się w C-końcowym fragmencie struktury, natomiast pętli 4–6 znajdują się we fragmencie N-końcowym białka [10, 36]. Obie domeny N- i C-końcowa mają zdolność do tworzenia

połączeń z MMPs, natomiast największa aktywność inhibicyjna związana jest głównie z możliwością tworzenia wiązań pomiędzy N-końcem TIMP a N-końcem enzymu. Aktywność inhibicyjna poszczególnych białek TIMP jest różna w stosunku do różnych MMPs. Domena C-końcowa (pętla 4–6) TIMP-1 ma większe powinowactwo do domeny hemopeksynopodobnej MMP-9 niż do domeny hemopeksynopodobnej MMP-2. C-końcowa domena TIMP-2 ma natomiast znacznie większe zdolności do wiązania z domeną hemopeksynopodobną MMP-2 [9, 10, 25]. Paradoksalnie TIMP-2 ma działanie nie tylko inhibicyjne, ale również bierze udział w procesie aktywacji MMP-2 przy udziale MMP-14. TIMP-3 wykazuje znacznie większe powinowactwo w stosunku do MMP-9 niż pozostałe białkowe inhibitory [10, 38]. Białka TIMPs oprócz inhibicji metaloproteinaz mają także zdolność pobudzania wzrostu komórek, a także supresji sygnałów prowadzących do pobudzenia mitozy oraz apoptozy [38].

Do endogennych inhibitorów metaloproteinaz należy także trombospondyna-2, trombospondyna-1, niewielkie cząsteczki białkowe z fragmentami homologicznymi do TIMPs, inhibitor związany z błoną komórkową RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*) oraz  $\alpha 2$ -makroglobulina, będąca białkiem osoczymym. Bierze ona udział w nieodwracalnej inhibicji MMPs [8, 27].

Zmniejszenie aktywności MMPs możliwe jest także na etapie transkrypcji, poprzez zablokowanie odcinków DNA, które kodują poszczególne enzymy. Zmniejszenie aktywności może też odbywać się poprzez zablokowanie aktywnych już form enzymów.

#### 4. PRZEBUDOWA MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Aby komórki rakowe mogły pokonać gęstą sieć elementów budujących macierz zewnątrzkomórkową, niezbędna jest proteoliza poszczególnych składników tego środowiska. Szczególna rola w procesie proteolizy składników ECM związana jest z aktywnością metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Szczególne znaczenie dla zagrożenia migracją komórek ma proteolityczne działanie MMPs na E-kadherynę, białko adhezyjne, które uczestniczy w interakcji pomiędzy komórkami. Cząsteczka E-kadheryny zlokalizowana jest na powierzchni komórek nabłonkowych. Degradacja białka prowadzi do zaburzenia oddziaływań międzykomórkowych, a także inicjuje proces transformacji komórek nabłonkowych w komórki mezenchymatyczne. Taka zmiana fenotypu komórkowego związana jest ze stopniem zaawansowania oraz złośliwością nowotworu. [8, 14, 38]. Żelatynaza A (MMP-2) oraz żelatynaza B (MMP-9) mają największe zdolności do degradacji białka kolagenowego typu IV, będącego głównym składnikiem błony podstawnej [42]. MMP-2 ulega ekspresji w bardzo wczesnej fazie raka piersi i jest traktowana, jako jeden z pierwszych czynników umożliwiających formowanie się nowotworu. W większości przypadków jest nieobecna w normalnej dorosłej tkance piersi, ale ulega ekspresji w łagodnych nowotworach, takich jak np. włókniaki [35]. Uszkodzenia struktury błony podstawnej stanowią jeden z elementów warunkujących migrację komórek. Metaloproteinazy te odgrywają krytyczną rolę w procesie transformacji nowotworu *in*



*situ* w jego postać inwazyjną. Wzrost ekspresji MMPs głównie MMP-2 oraz MMP-9 odpowiedzialnych za degradację kolagenu typu IV został stwierdzony w tkankach nowotworowych tych nowotworów piersi, których komórki mają zdolność do tworzenia przerzutów. Natomiast wzrost ekspresji enzymów nie został potwierdzony w tkance nowotworowej *in situ* [7, 12]. Ekspresja MMP-2 zachodzi głównie w zrębie złośliwych nowotworów i jest zwiększana przez parakrynnie pobudzanie mediowane przez czynniki rozpuszczalne. Dla odmiany ekspresja MMP-9 w fibroblastach pochodzących z tkanki nowotworowej wymaga bezpośredniego kontaktu ze złośliwym nabłonkiem nowotworowym [35].

## 5. ROLA METALOPROTEINAZ MMP-2 ORAZ MMP-9 W PROCESACH NOWOTWOROWYCH

Dotychczas rola metaloproteinaz w procesach nowotworowych ograniczona była jedynie do udziału w inwazji i tworzeniu przerzutów. Jednak wykazano także działania MMPs na innych etapach karcinogenezy.

### 5a. MMPs a procesy wzrostu i apoptozy komórek nowotworowych

MMPs regulują procesy wzrostu oraz proliferacji komórek. W prowadzonych badaniach doświadczalnych wykazano, iż proliferacja komórek nowotworowych u myszy, które nie miały genu kodującego MMP-9 była w znacznym stopniu zahamowana [8].

MMPs generują sygnały pobudzające komórki do intensywnego namnażania się, uwalniają związane z błoną komórkową prekursorzy czynników wzrostu, np. TGF- $\alpha$ . Rozkładają kompleks IGF-BP (*insulin-like growth factor-binding protein*), uwolniony zostaje czynnik IGF, który pobudza wzrost komórek nowotworowych. MMP-9 obniża także zdolność komórek nowotworowych do apoptozy [7, 8].

### 5b. MMPs a tworzenie przerzutów

Rola MMPs w procesach tworzenia przerzutów jest znana już od kilku lat. Potencjał inwazyjny nowotworu może być zależny od interakcji pomiędzy MMPs a TIMPs. Przewaga aktywności enzymów nad ich tkankowymi inhibitorami prowadzi do zwiększenia potencjału inwazyjnego [22]. Pierwszym krokiem jest migracja komórek nowotworowych do otaczających tkanek, a następnie do tkanek znacznie oddalonych od miejsca pierwotnego guza [6, 3]. Aby proces ten mógł zaistnieć, niezbędne jest zmniejszenie adhezyjności komórek nowotworowych do podłoża. Dochodzi do tego na skutek degradacji białek adhezyjnych, w tym E-kadheryny przez metaloproteinazy [8, 38]. MMP-2 oraz MMP-14 degradują lamininę-5 w błonie podstawnej. W wyniku tego działania odsłonięciu ulega miejsce w strukturze lamininy, które w warunkach fizjologicznych jest ukryte. Ekspozycja tej części białka inicjuje migrację komórek nowotworowych. Podczas wędrówki komórki muszą odłączyć się od sąsiadujących komórek oraz od otaczających je składników macierzy zewnątrzkomórkowej.

Niezbędnym do tego procesu jest lokalizacja MMP-9 na powierzchni błony komórkowej [8]. Na błonie komórek nowotworowych obecne jest białko adhezyjne CD44 będące głównym receptorem dla kwasu hialuronowego. Łączy się także z MMP-9 wiążąc tym samym tę metaloproteinazę na powierzchni komórki nowotworowej. Powstały kompleks sprzyja inwazyjności komórek guza [8, 18]. Kompleks CD44 - MMP-9 rozkładany jest przez MMP-14 i uwolniona zostaje pozakomórkowa domena, co powoduje zmniejszenie inwazyjności nowotworu [8].

### 5c. MMPs a angiogeneza

Angiogeneza warunkuje lokalny rozwój nowotworów, a także umożliwia tworzenie przerzutów. Zahamowanie procesu angiogenezy prowadzi do supresji wzrostu guza oraz uniemożliwia migrację komórek nowotworowych do innych tkanek [18, 43, 44]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że endogenne inhibitory MMPs redukują powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Nasuwa się zatem wniosek, że MMPs wyraźnie zwiększają możliwości angiogenezy. MMPs degradują składniki ECM, dzięki czemu komórki nabłonkowe przenikają w głąb zrębu nowotworu. Przeprowadzono szereg badań *in vitro* oraz wiele eksperymentów na modelach zwierzęcych, z których wynika, że MMP-2, MMP-9 oraz MMP-14 są bezpośrednimi regulatorami angiogenezy [8, 26]. MMPs degradują kolagen typu IV, I oraz fibronektynę, co powoduje rozluźnienie ścisłej struktury ECM i umożliwia przenikanie komórek nabłonkowych, które dadzą początek nowym naczyniom krwionośnym. Rozkład kolagenu typu IV dodatkowo sprzyja procesowi angiogenezy przez umożliwienie połączenia pomiędzy zdegradowanym kolagenem IV a integryną  $\alpha v \beta 3$ . Metaloproteinazy zwiększają dostępność proangiogennych czynników wzrostu np. VEGF, FGF-2, TGF- $\beta$ . Czynniki te stymulują proliferację i migrację komórek nabłonkowych, w wyniku czego dochodzi do organizowania nowych naczyń krwionośnych [8, 21, 44].

### 5d. MMPs a odpowiedź immunologiczna organizmu

Układ odpornościowy jest zdolny do rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych poprzez takie komórki, jak: makrofagi, limfocyty T, limfocyty NK i neutrofile. Komórki nowotworowe wykształciły wiele systemów umożliwiających uniknięcie zniszczenia przez układ immunologiczny. Jednym z takich systemów są metaloproteinazy [8]. Istotnym czynnikiem do wzbudzenia reakcji odpornościowej jest proliferacja limfocytów T pod wpływem stymulującego działania kompleksu IL-2- R $\alpha$  (*interleukin-2-receptor- $\alpha$* ). MMPs, a szczególnie MMP-9 mają zdolność do rozkładu tego kompleksu, przez co następuje oczywisty spadek proliferacji limfocytów T, a tym samym znaczące zahamowanie reakcji odpornościowej typu komórkowego [8, 33]. MMPs aktywują również TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*), który jest jednym z inhibitorów odpowiedzi limfocytów T skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym [11]. MMP-9 degraduje IL-8 (*interleukin-8*), która jest chemoatraktantem dla fagocytykujących komórek. W procesach nowotworowych, w tym także w nowotworach gruczołu piersiowego, pojawiają się komórki zapalne. Komórki te

produkują wiele różnych MMPs, w tym także MMP-9, MMP-12, MMP-14, a zatem pośrednio biorą udział w stymulacji progresji nowotworu i zapewniają komórkom nowotworowym ochronę przed działaniem układu immunologicznego [8].

## 6. PODSUMOWANIE

Wczesna diagnoza i określenie stanu zaawansowania nowotworu pozwala na zwiększenie przeżywalności chorych na nowotwory piersi. Ważne jest poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i diagnostycznych, które umożliwią wczesne wykrycie nowotworów piersi, a jednocześnie pozwolą na wykorzystanie dostępnych możliwości leczenia w postaci chemioterapii, radioterapii lub hormonoterapii obok zabiegu operacyjnego [16, 39]. Wprowadzenie wczesnej diagnozy i skutecznego leczenia staje się misją współczesnej ochrony zdrowia, zwłaszcza w przypadku tak częstego schorzenia, jakim jest rak piersi u kobiet. Uczestnictwo MMP-2 oraz MMP-9 zarówno w angiogenezie, jak i inwazyjności oraz progresji nowotworu i zwiększenie ich ekspresji zgodne z powiększeniem stopnia zaawansowania nowotworu staje się niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [13]. Kobiety, u których w tkance nowotworowej guza piersi stwierdzono zwiększoną ekspresję MMP-2, mają znacznie gorsze rokowania. MMP-9 wykazuje wysoką ekspresję w nowotworze gruczołu piersiowego i wydaje się być związane z tworzeniem przerzutów do węzłów limfatycznych. Głębsze poznanie działania metaloproteinaz zbliża naukę do możliwości odkrycia coraz to nowszych endo- i egzogennych inhibitorów, które zwiększą szansę selektywnego blokowania poszczególnych enzymów, w tym MMP-2 oraz MMP-9.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BORKAKOTI N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med* 2000; **78**: 261–268.
- [2] CAUDROYL S, POLETTE M, NAWROCKI- RABY B, CAO J, TOOLE BP, ZUCKER S, BIREMBAUT P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; **19**: 697–702.
- [3] CLENDENINN NJ, APPELT K. Matrix metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. Totowa, Humana Press 2000.
- [4] DERYUGINA EJ, RATNIKOV B, MONOSOV E, POSTNOVA TJ, DISCIPIO R, SMITH JW, STRONGIN AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha v \beta 3$  promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001; **263**: 209–223.
- [5] DEVLIN TM Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Fifth Edition Willey-Liss, New York 2002.
- [6] DJONOV V, CRESTO N, AEBERSOLD DM, BURRI PH, ALTERMATT HJ, HRISTIC M, BERDAZ G, ZIEMIECKI A, ANDRES AC. Tumor cell specific expression of MMP-2 correlates with tumor vascularisation in breast cancer. *Int J Oncol* 2002; **21**: 25–30.
- [7] DUFFY MJ, MAGUIRE TM, HILL A, McDeRMOTT E, O'HIGGINS N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; **2**: 252–257.
- [8] EGEBLAD M, WERB Z. New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev* 2002; **2**: 161–173.

- [9] EMARA M, WOŹNIAK M. Role of metalloproteinases in cancer cell invasiveness. *Diagn Lab* 1999; **35**: 381–397.
- [10] GACKO M. Mechanizmy aktywacji, znaczenie biologiczne i inhibitory metaloproteaz macierzy międzykomórkowej. *Post Hig Med Dośw* 2001; **2**: 303–318.
- [11] GORELIK L, FLAVELL RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- $\beta$  signaling in T cells. *Nat Med* 2001; **7**: 1118–1122.
- [12] GRIEU F, QI LI W, IACOPETTA B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2004; **88**: 197–204.
- [13] HAGEMAN T, ROBINSON SC, SCHULZ M, TRÜMPER L, BALKWILL F, BINDER C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- $\alpha$  dependent up-regulation of matrix metalloproteinases. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 1543–1549.
- [14] HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57–70.
- [15] HELMREICH EJM. *The Biochemistry of Cell Signalling*. Oxford University Press 2001.
- [16] HIRVONEN R, TALVENSAAARI-MATTILA, PÄÄKKÖ P, TRUPEENIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) in T<sup>sub1-2</sup>N<sup>sub0</sup> breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; **77**: 85–91.
- [17] HOLBRO T, BEERLI RR, MAURER F, KOZICZAK M, BARBAS CF, HYENS NE. The ErbB2/ ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8933–8938.
- [18] JOHN A, TUSZYNSKI G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; **7**: 14–23.
- [19] KAJITA M i in. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; **153**: 893–904.
- [20] KIM JH, LEE KW, LEE MW, LEE HJ, KIM SH, SURH YJ. Hirsutenone inhibits phorbol ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 in cultured human mammary epithelial cells: NF-kappaB as a potential molecular target. *FEBS Letters* 2006; **580**: 385–392.
- [21] KUMAR V, COTRAN RS, ROBBINS SL. *Patologia*. wydanie I polskie pod redakcją Włodzimierza T. Olszewskiego, Wydawn. Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2005.
- [22] LI M, YINGQUN W, HUNG M-C, KANNAN P. Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2 $\alpha$  and activates HER-2/neu gene in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; **118**: 802–811.
- [23] MARTINEZ SR, YOUNG SE, GIULIANO AE, BILCHIK AJ. The utility of estrogen receptor, progesterone receptor, and Her-2/neu status to predict survival in patients undergoing hepatic resection for breast cancer metastases. *Am J Surg* 2006; **191**: 281–283.
- [24] NABESHIMA K, INOUE T, SHIMANO Y, SAMESHIMA T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; **52**: 255–264.
- [25] NAKOPOULOU L, TSIRMPA I, ALEXANDROU P, LOUVROU A et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2003; **77**: 145–155.
- [26] OH J, TAKAHASHI R, KONDO S, MIZOGUCHI A, ADACHI E, SASAHARA R M, NISHIMURA S, IMAMURA Y, KITAYAMA H, ALEXANDER DB, IDE CH, HORAN TP, ARAKAWA T, YOSHIDA H, NISHIKAWA S, ITOH Y, SEIKI M, ITOHARA S, TAKAHASHI CH, NODA M. The membrane- anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001; **107**: 789–800.
- [27] PALOSAARI H. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue. The regulation of expression of fibrillar collagens, MMPs and TIMPs by growth factors, transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). University of Oulu, Oulu Finland 2003.
- [28] PARKS WC, MECHAM RP. *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press, New York: 1998.
- [29] PELLIKAINEN JM, ROPPONEN KM, KATAJA VV, KELLOKOSKI JK, ESKELINEN MJ, KOSMA VM. Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2 and prognosis. *Clinical Cancer Res* 2004; **10**: 7621–7628.
- [30] RAY JM, STETLER-STEVENSON WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; **7**: 2062–2072.
- [31] ROEB E, SCHLEINKOFER K, KERNEBECK T, POTSCHE S, JANSEN B, BEHRMANN I, MATERN S, GROTZINGER J. The matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* 2002; **277**: 50326–50332.

- [32] SAKORAFAS GH, TSIOTOU AG. Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective. *Br J Surg* 2000; **87**: 149–162.
- [33] SAWICKI G, RADOMSKI M. Nowe aspekty biologii metaloproteinaz przestrzeni międzykomórkowej (MMPs). *Diagn Lab* 1999; **35**: 373–380.
- [34] SHEU BC, HSU SM, HO HN, LIEN HC, HUANG SC, LIN RH. A novel role of metalloproteinases in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001; **61**: 237–242.
- [35] SINGER CHF, KRONSTEINER N, MARTON E, KUBISTA M, CULLEN KJ, HIRTENLEHNER K, SEIFERT M, KUBISTA E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat* 2002; **72**: 69–77.
- [36] SINGH S, BARRETT J, SAKATA K, TOZER RG, SINGH G. ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis. *Curr Drug Targets* 2002; **3**: 359–367.
- [37] STACHURA J, DOMAGAŁA W. Patologia znaczy słowo o chorobie. t. I Patologia Ogólna, PAUWL, Kraków 2003.
- [38] STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 463–516.
- [39] TALVENSAARI-MATTILA A, PÄÄKKÖ P, BLANCO-SEQUEIROS G, TURPEENIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001; **65**: 55–61.
- [40] TAO Y, MAEGAWA H, UGI S, IKEDA K, NAGAI Y, EGAWA K, NAKAMURA T, TSUKADA S, NISHIO Y, MAEDA S, KASHIWAGI A. The transcription factor AP-2 $\beta$  causes cell enlargement and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 2006; **147**: 1685–1696.
- [41] WANG Z, JUTTERMANN R, SOLWATY PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26411–26415.
- [42] WERB Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; **91**: 439–442.
- [43] XU J, RODRIGUEZ D, PETITCLERC E, KIM JJ, HANGAI M, YUEN SM, DAVIS GE, BROOKS PC. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Cell Biol* 2001; **154**: 1069–1079.
- [44] ZAMAN K, DRISCOLL R, HAHN D, WERFFELI P, GOODMAN S.L, BAUER J, LEYVRAZ S, LEJEUNE F, STUPP R, RÜEGG C. Monitoring multiple angiogenesis-related molecules in the blood of cancer patients shows a correlation between VEGF-A and MMP-9 levels before treatment and divergent changes after surgical vs. conservative therapy. *Int J Cancer* 2005; **118**: 775–764.
- [45] Krajowy Rejestr Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej. <http://85.128.14.124/km>.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 29.05. 2006 r.

Przyjęto: 11.09. 2006 r.

ul. Medyczna 9, 30- 688 Kraków

e-mail: [alapka@cm-uj.krakow.pl](mailto:alapka@cm-uj.krakow.pl).



## NAPRAWA DNA PRZEZ WYCINANIE NUKLEOTYDÓW W KOMÓRKACH SSAKÓW\*

### NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN MAMMALIAN CELLS

Tomasz ŚLIWIŃSKI, Janusz BŁASIAK

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Naprawa DNA przez wycinanie nukleotydu (NER) jest jedną z najważniejszych odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, wnoszącą istotny wkład w utrzymanie stabilności genomowej. W NER usuwane są obszerne addukty oraz uszkodzenia zniekształcające strukturę DNA, takie jak wywołane przez promieniowanie UV cyklobutanowe dimery pirymidyny czy 6–4 fotoprodukty. NER cechuje heterogenność naprawy genomu, związana z organizacją chromatyny w transkrypcyjnie aktywnych i nieaktywnych domenach genomu oraz znaczeniem sekwencji w obrębie genów. Uszkodzenia DNA wywołane przez promieniowanie UV usuwane są przez dwa szlaki: globalną naprawę DNA oraz naprawę sprzężoną z transkrypcją. Naprawa w pierwszym szlaku zachodzi wolniej niż w szlaku drugim i ma charakter losowy, natomiast naprawa w szlaku sprzężonym z transkrypcją prowadzoną przez polimerazę RNA II jest wysoce specyficzna. Zrozumienie mechanizmów naprawy przez wycinanie nukleotydu u ssaków może mieć ważne znaczenie w profilaktyce i terapii poważnych chorób, w tym nowotworów złośliwych.

*Słowa kluczowe:* naprawa przez wycinanie nukleotydu, uszkodzenia DNA, syndrom Cockayne'a, *xeroderma pigmentosum*.

*Summary:* Nucleotide excision repair (NER) is one of the main cellular reaction to DNA damage, contributing to genomic stability. NER is a major cellular pathway that removes bulky DNA adducts and helix-distorting lesions, such as the UV-induced photoproducts cyclobutane pyrimidine dimers and 6–4 pyrimidine photoproducts. The heterogeneity of NER seems to be governed by the functional compartmentalization of chromatin into transcriptionally active and inactive domains as well as by functional role of sequences within genes. UV-induced DNA damages are removed by global genome repair and transcription coupled repair. Global genome repair is a random process that occurs slowly, while the transcription coupled repair, which is tightly linked to RNA polymerase II transcription, is highly specific and efficient. Understanding of these pathways may be important in the prevention and therapy of serious diseases, including cancer.

*Key words:* nucleotide excision repair, DNA damage, Cockayne syndrome, *xeroderma pigmentosum*.

\*Praca wykonana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji nr 3 P04A 032-25.

## WPROWADZENIE

Czynniki środowiskowe i endogenne produkty metabolizmu mogą oddziaływać z komórkowym DNA wywołując jego modyfikacje, które mogą prowadzić do mutacji, niestabilności genomowej, transformacji nowotworowej czy też wreszcie śmierci komórki. Dlatego naprawa DNA odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki. W naprawie DNA przez wycinanie nukleotydów (NER) usuwane jest szerokie spektrum uszkodzeń DNA. Substratami dla NER są uszkodzenia powodujące zniekształcenie drugorzędowej struktury DNA lub blokujące procesy replikacji i transkrypcji. Przykładem takich uszkodzeń są cyklobutanowe dimery pirymidyny (CPDs) oraz 6–4 fotoprodukty (6–4 PPs), wywoływane przez promieniowanie UV [90].

Większość badań systemu NER u ssaków wykonywana jest z użyciem komórek mających mutacje białek uczestniczących w różnych etapach naprawy, w tym komórek człowieka charakterystycznych dla chorób określanych jako genetyczne: *xeroderma pigmentosum* (XP), syndrom Cockayne'a (CS), czy trichotiodystrofia (TTD). Chociaż objawy kliniczne tych schorzeń są różne, od wysokiej podatności na nowotwory do wczesnego starzenia się, mogą one być związane z określoną wrażliwością na światło słoneczne. Komórki te są zróżnicowane pod względem genetycznym, z wieloma grupami komplementacyjnymi, reprezentowanymi przez różne geny naprawy. Kodowane przez te geny białka nazwane zostały zgodnie z ich przynależnością do określonych grup komplementacyjnych [6, 24]. Dla syndromu XP zostało zidentyfikowanych siedem grup (XPA-XPG) oraz dwie dla CS (CSA, CSB).

NER jest procesem stosunkowo złożonym przebiegającym przy udziale wielu białek, a powiązanie jej mechanizmów z objawami klinicznymi jest przedmiotem badań. Etapy podstawowych szlaków tego szlaku naprawy są zasadniczo niezmiennie ewolucyjnie w komórkach zarówno pro-, jak i eukariotycznych [65].

## PODSTAWOWE ETAPY NER

Naprawa sprzężona z transkrypcją (TCR) jest związana z uszkodzeniami występującymi w genach transkrybowanych, natomiast naprawa związana z pozostałą częścią genomu nazywana jest globalną naprawą DNA przez wycinanie nukleotydów (GGR) [30]. Prawdopodobnie TCR może być realizowana zarówno przez wycinanie zasad (BER), jak i nukleotydów; to który z tych szlaków naprawy DNA będzie „egzekutorem” TCR, zależy od rodzaju uszkodzenia. Pierwszym etapem w NER jest rozpoznanie uszkodzenia. Etap ten jest różny w zależności od tego, czy zachodzi TCR, czy też GGR (ryc. 1).

### Rozpoznanie uszkodzeń w DNA. Globalna naprawa DNA

W GGR kompleks białkowy XPC-hHR23B jako pierwszy rozpoznaje uszkodzenie w DNA [89]. Jest on bardzo ważny dla przyłączenia do miejsca uszkodzenia kolejnych czynników NER [89]. Kompleks ten lokalizuje uszkodzenie na podstawie wywoływanego przez nie zaburzenia w drugorzędowej strukturze DNA [16]. Im silniejsze zniekształcenie



podwójnej helisy DNA, tym szybciej kompleks XPC-hHR23B umiejscawia uszkodzenie i umożliwia jego usunięcie. Z tego względu (6–4) fotoprodukty usuwane są z cząsteczki DNA z większą wydajnością niż cyklobutylowe dimery pirymidynowe, gdyż wywoływane przez CPDs zniekształcenia w strukturze DNA są na tyle niewielkie, że nie są rozpoznawane z wysoką wydajnością przez kompleks XPC-hHR23B [18]. Czynnikiem, który ułatwia wykrywanie uszkodzenia przez XPC-hHR23B, jest czynnik wiążący uszkodzony DNA (DDB) – heterodimer białek p127 i p48, który łączy się z DNA w miejscu uszkodzenia [23, 45]. Oprócz wprowadzania przez białko DDB zagięcia DNA o kąt 55° w pobliżu CPD, będącego sygnałem do przyłączenia kompleksu XPC-hHR23B, czynnik ten pośredniczy w acetylacji bądź ubikwitynacji białek, w tym histonów, znajdujących się w pobliżu uszkodzenia [22]. Aktywności te pozwalają na rozluźnienie struktury nukleosomowej i zwiększają dostępność substratu dla białek naprawy systemu NER [18].

Białko hHR23 zawiera dwie domeny ubikwitynowe oraz wiąże i stymuluje białko XPC *in vitro* [41]. Domena białka XPC oddziałująca z DNA znajduje się w regionie C-końcowym, częściowo pokrywając regiony oddziałujące z innymi czynnikami systemu NER, np. hHR23, oraz czynnikiem transkrypcyjnym TFIIH [82].

Uszkodzenia wywołujące wiązania krzyżowe w DNA blokują jego funkcje, co może prowadzić do transformacji nowotworowej bądź śmierci komórki. Kluczowym kompleksem białkowym rozpoznającym tego typu uszkodzenia jest XPA-RPA [23]. Z ostatnich badań wynika, że również kompleks XPC-hHR23B rozpoznaje uszkodzenia wywołujące wiązania krzyżowe w DNA zarówno samodzielnie, jak i współdziałając z kompleksem XPA-RPA [23, 76].

### Naprawa sprzężona z transkrypcją

W transkrypcyjnie aktywnych obszarach genomu, naprawa sprzężona z transkrypcją wydajnie usuwa różne typy uszkodzeń i przebiega szybciej niż w pozostałej części genomu [58, 84]. Wiele uszkodzeń DNA blokuje proces elongacji transkrypcji, powodując zatrzymanie polimerazy RNA, podczas gdy w niciach nietranskrybowanych uszkodzenia te są omijane [57]. Prawdopodobnie w TCR przy rozpoznaniu uszkodzenia w DNA funkcję kompleksu XPC/hHR32B przejmuje kompleks polimerazy RNA II, której zatrzymanie jest sygnałem dla białek CSA i CSB [18, 84]. CSA zawierające motywy, który może oddziaływać z CSB i XAB2 pełniąc rolę platformy umożliwiającej utworzenie kompleksu białek systemu NER [18]. CSA stabilizuje ponadto przejściowe połączenie pomiędzy białkiem CSB a unieruchomioną polimerazą RNA II, nie oddziałując przy tym z kompleksem elongacyjnym. CSB powoduje rozluźnienie połączenia kompleks elongacyjny - DNA dzięki aktywności ATPazy zależnej od DNA. Ponadto czynnik ten oddziałuje z białkami biorącymi udział w kolejnych etapach naprawy, z TFIIH i XPA, zwiększając tempo tworzenia kompleksu naprawczego [71]. Stosunkowo niedawno odkryto nowe białko, które może brać udział w TCR, jest to białko XAB2, zbudowane z 855 aa składających się głównie z 15 powtórzeń 34-peptydowych (TPR). XAB2 oddziałuje z CSA, CSB, XPA, jak również z polimerazą RNA II. Przeciwciała dla XAB2 hamują zarówno TCR, jak i transkrypcję *in vivo*, nie wpływają zaś na GGR [62].

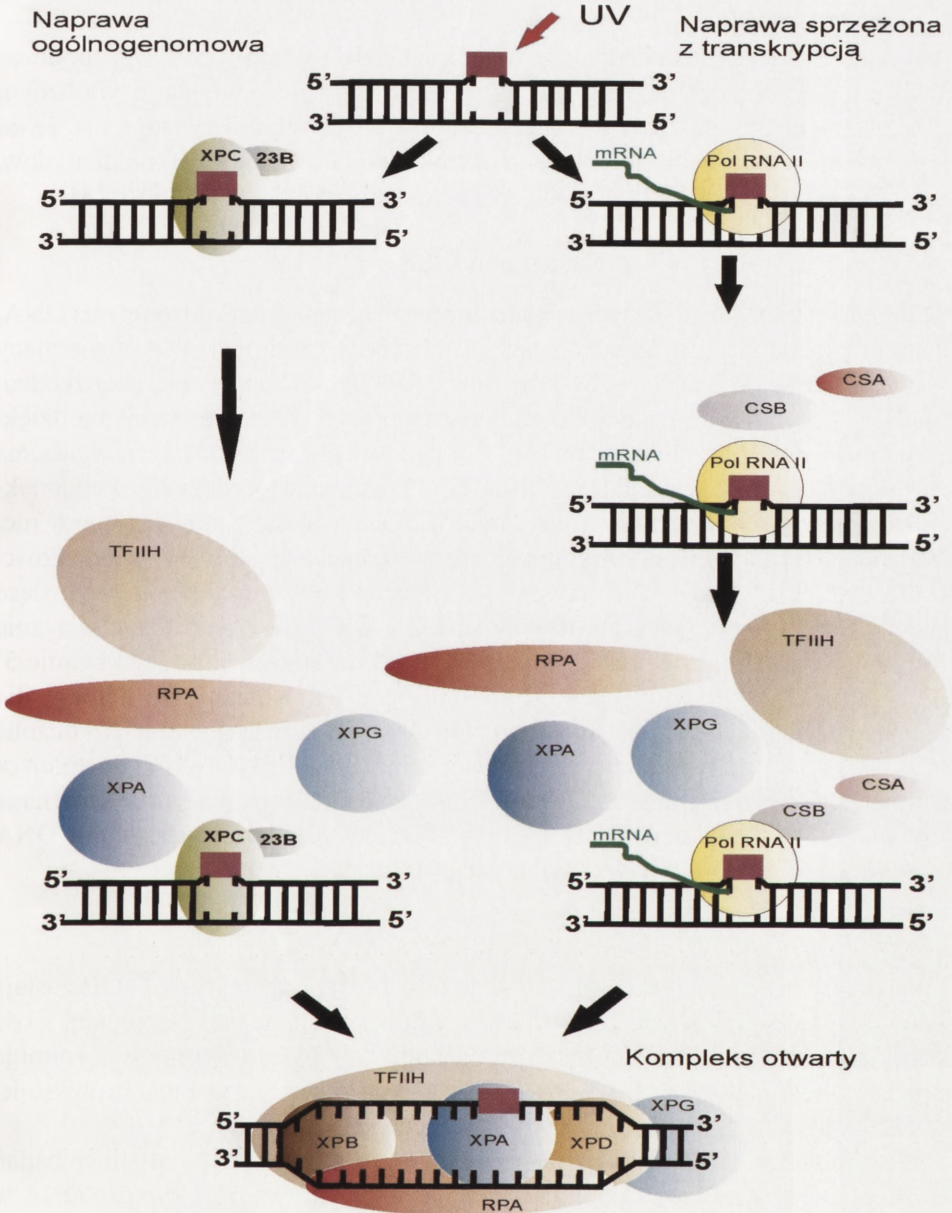
Na podstawie dotychczasowej wiedzy o funkcji białek uczestniczących w TCR można rozważać schemat rozpoznania uszkodzenia i zapoczątkowania naprawy w tym szlaku w komórkach ssaków (ryc.1). Polimeraza RNA II zatrzymuje się w miejscu uszkodzenia, dzięki czemu zostaje rozpoznana przez kompleks CSA-CSB, który odsuwa ją od tego miejsca. CSA-CSB wiąże również białko XPA i TFIIH i przyspiesza tym samym tworzenie kompleksu inicjującego NER. W komórkach ssaków na TCR może wpływać położenie kompleksu transkrypcyjnego w miejscu uszkodzenia, jak również bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy białkami NER i czynnikami transkrypcyjnymi. Białka CSA, CSB, TFIIH i XAB2 mogą odgrywać ważną rolę w przebudowie kompleksu transkrypcyjnego, podnosząc efektywność TCR. W zależności od rodzaju uszkodzenia w takim DNA zachodzi określony typ naprawy związany z transkrypcją. Oprócz NER związek z transkrypcją może mieć BER, jeśli zaburzenia w nici transkrybowanej DNA mają charakter modyfikacji zasad, które są substratem dla BER [46]. Glikozylazy DNA, enzymy uczestniczące w naprawie przez wycinanie zasad, powodują zablokowanie działania polimerazy RNA, podobnie jak uszkodzenia rozpoznawane przez NER, co staje się sygnałem dla białek uczestniczących w naprawie DNA związanej z transkrypcją. Wyniki ostatnich badań wskazują, że jedno z uszkodzeń oksydacyjnych będących substratem dla BER, 8-oksoguanina, nie blokuje elongacji polimerazy RNA u *E. coli*, w przeciwieństwie do produktu pośredniego naprawy tego uszkodzenia, spowodowanego przez Endo III [88]. Wyniki te sugerują sprzężenie BER z TCR poprzez produkty pośrednie naprawy przez wycinanie zasad, które mogą blokować działanie polimerazy RNA [11]. To może wyjaśniać brak aktywności TCR podczas naprawy uszkodzeń alkilacyjnych, ponieważ miejsca apurynowe/apirymidynowe, powstałe w wyniku aktywności glikozylaz jednofunkcyjnych na uszkodzenia alkilacyjne DNA, nie powodują zatrzymania działania kompleksu polimerazy RNA [73]. To czy taki związek występuje w komórkach ssaków, jest sprawą otwartą i wymaga dalszych badań.

### Tworzenie otwartego kompleksu naprawczego

Po rozpoznaniu uszkodzenia następuje wytworzenie naprawczego kompleksu otwartego, umiejscowionego w jego pobliżu. Wymagane jest do tego celu współdziałanie kompleksu XPC-hHR23B oraz innych czynników systemu NER: TFIIH, XPA, RPA oraz XPG [20, 77].

TFIIH jest kompleksem zawierającym co najmniej sześć białek, w skład którego wchodzi między innymi XPB oraz XPD wykazujące aktywność helikazy DNA, jak również ATPazy zależnej od DNA [72]. Białko XPB denaturuje nici DNA w kierunku 3' → 5', podczas gdy XPD w przeciwnym, wykorzystując energię z hydrolizy ATP [36].

XPA wiąże się z DNA i wykazuje powinowactwo do uszkodzeń wywoływanych przez promieniowanie UV [60]. Stopień tego powinowactwa jest związany ze stopniem zniekształcenia struktury DNA. Istotną rolę XPA jest udział w odpowiednim rozmieszczeniu białek kompleksu naprawczego względem siebie [16]. Co więcej, XPA bierze udział w weryfikacji uszkodzenia, wskazując tym samym, że rozpoznaje charakter modyfikacji struktury DNA oraz „zaznacza” nią DNA, w obrębie której występuje uszkodzenie [50]. Ponadto XPA, w połączeniu z RPA, uwalnia białka XPC-hHR23B z



RYCINA 1. Rozpoznanie uszkodzenia przez czynniki uczestniczące w NER oraz wytworzenie naprawczego kompleksu otwartego. W globalnej naprawie przez wycinanie nukleotydów uszkodzenie (różowy kwadrat) zostaje rozpoznane przez kompleks XPC-hHR23B (zielony i ciemnozielony), następnie zostają przyłączone XPA, RPA, TFIIH i XPG (odpowiednio: ciemnoniebieski, czerwony, brązowy i jasnoniebieski) i zostaje utworzony kompleks otwarty. W naprawie sprzężonej z transkrypcją polimeraza RNA II (żółty) zatrzymuje się przed uszkodzeniem i jest to sygnałem dla przyłączenia białek CSA i CSB (odpowiednio różowy i fioletowy). Następnie przyłączane są białka takie jak w globalnej naprawie i zostaje utworzony kompleks otwarty (oryginalne)

kompleksu naprawczego, umożliwiając ponowne ich wykorzystanie w rozpoczęciu kolejnej naprawy [18].

Podjednostka RPA, składająca się z 3 domen DBD wiążących DNA, podczas naprawy pokrywa około 30 nukleotydów na nici nieuszkodzonej, chroniąc ją tym samym przed działaniem endonukleaz. Wyniki badań prowadzonych *in vitro* sugerują, że do zabezpieczenia jednoniciowego DNA na odcinku o długości około 30 nukleotydów, niezbędny jest udział tylko jednej cząsteczki heterotrimerycznego RPA [16, 18].

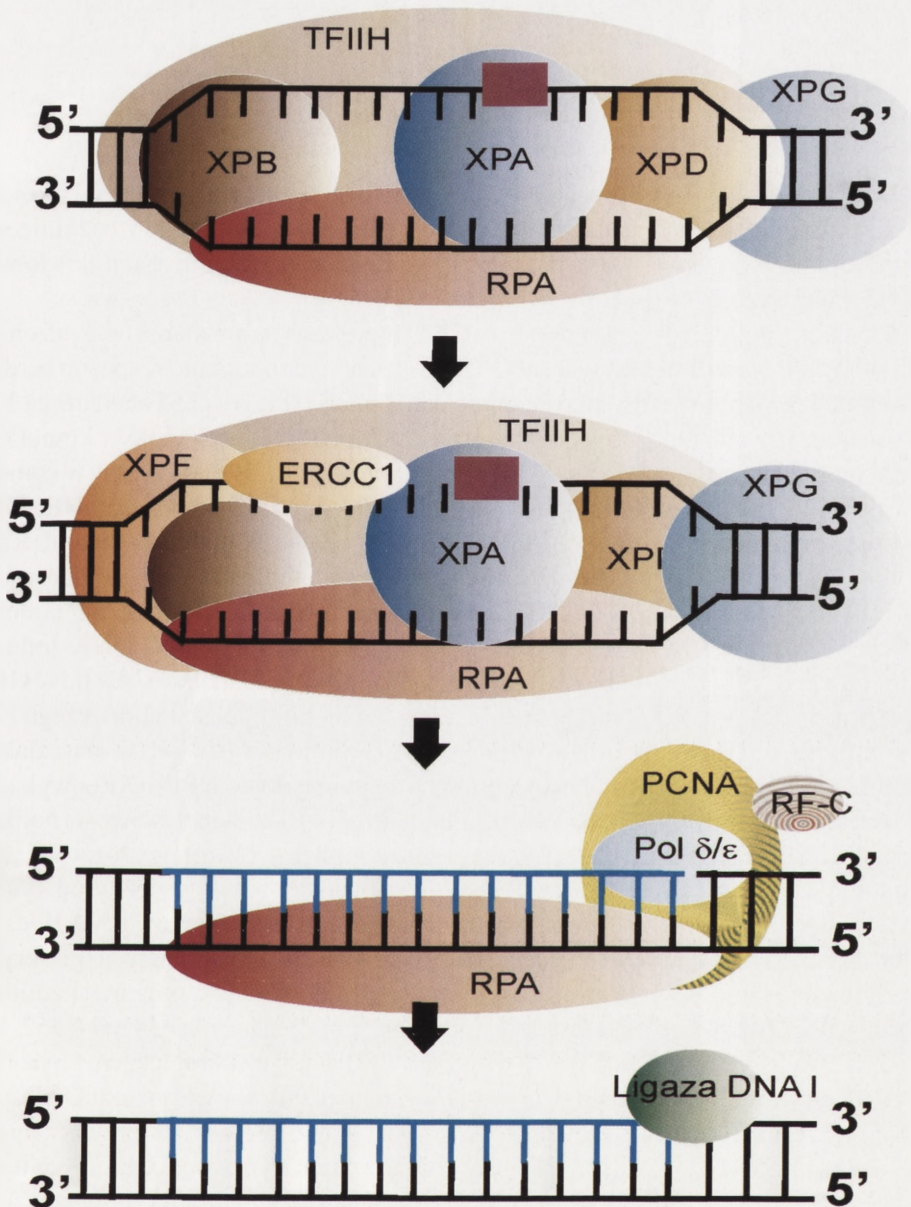
### Nacięcie nici DNA

Kolejnym etapem NER jest wprowadzenie dwóch nacięć w uszkodzonej nici DNA, po jednym z każdej strony uszkodzenia (ryc. 2). Usuwany fragment DNA zawierający uszkodzenie liczy 25–32 nukleotydów [18]. Białko RPA oprócz ochrony nici nieuszkodzonej nadaje specyficzność endonukleazom występującym w etapie nacinania dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu z nimi [18]. Zorientowany w kierunku 3' od uszkodzenia jeden koniec RPA wiąże się z nukleazą ERCC1-XPF, a przeciwny oddziałuje z endonukleazą XPG. Oddziaływanie to powoduje hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w nici uszkodzonej [95]. Białko XPG dokonuje pierwszego cięcia po stronie 3' w odległości 3–9 nukleotydów od uszkodzenia, co wprowadza zmiany konformacyjne w DNA będące sygnałem dla przyłączenia endonukleazy ERCC1-XPF, która hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w odległości 16–25 nukleotydów od uszkodzenia, po jego stronie 5' [95]. Właściwe umiejscowienie obu endonukleaz jest kluczowym etapem dla precyzyjnego nacięcia uszkodzonego fragmentu DNA. RPA związane z nieuszkodzoną nicią wpływa na odpowiednie przyłączenie kompleksu ERCC1-XPF do miejsca uszkodzenia, a oddziaływanie z XPA może ułatwiać i stabilizować umiejscowienie kompleksu na uszkodzonej nici DNA [80]. Wycięty uszkodzony fragment DNA oddysocjowuje, a w DNA pozostaje jednoniciowa luka.

### Synteza naprawcza DNA

Luka powstała po usunięciu uszkodzonego oligonukleotydu z grupą 3'-OH zostaje wypełniona przez polimerazę DNA [89]. Prawdopodobnie na tym etapie większość białek uczestniczących w NER opuszcza uszkodzony obszar i ich miejsce zajmuje kompleks syntezy naprawczej. Białko RPA jest wymagane przy wypełnianiu powstałej luki w DNA dla zabezpieczenia matrycy DNA przed nukleazami.

Dwie polimerazy DNA syntetyzują nowy fragment DNA. Wyniki ostatnich badań *in vitro* sugerują, że zarówno polimeraza  $\delta$ , jak i  $\epsilon$  przeprowadzają syntezę DNA w NER [35]. Do efektywnej syntezy naprawczej dla obu polimeraz wymagane są również inne czynniki pomocnicze, czyli kofaktory, takie jak jądrowy antygen komórek proliferujących (PCNA) oraz czynnik replikacyjny C (RF-C). Kofaktory te działają jako kompleks, który ułatwia związanie obu polimeraz. Kompleks ten jest wytwarzany po związaniu czynnika RF-C z końcem 3' starterów DNA, ułatwiając tym samym przyłączenie białka PCNA [16]. W badaniach *in vitro* potwierdzono opisany model uzyskując syntezę naprawczą w obecności pięciu składników: PCNA, RF-C, RPA oraz Pol  $\delta$  bądź Pol  $\epsilon$  [16, 18]. Ostatnim krokiem kończącym syntezę naprawczą NER



RYCINA 2. Nacinanie i synteza naprawcza w NER. Po utworzeniu kompleksu otwartego i rozpleceniu dupleksu DNA przez podjednostki TFIIH, helikazy XPB, XPD (odpowiednio: ciemno- i jasnobrązowy) następuje nacięcie uszkodzonej nici DNA przez endonukleazy XPG oraz ERCC1-XPF (pomarańczowy) odpowiednio po stronach 3' i 5' uszkodzenia. Następnie zachodzi synteza naprawcza, w której uczestniczą czynnik RC-F (naprzemiennie czerwony-szary), PCNA (naprzemiennie żółty-zielony) oraz polimeraza  $\delta/\epsilon$  (błękitny). Naprawę kończy ligaza DNA I (ciemnozielony) (oryginalne)

jest ligacja końca 5' nowo zsyntetyzowanej nici z oryginalną sekwencją. Proces ten jest przeprowadzany przez ligazę DNA I [16].

## BIĄŁKA NER

W naprawie DNA przez wycinanie nukleotydów u ssaków bierze udział około 30 białek. Podzielić je można na białka uczestniczące w rozpoznaniu uszkodzenia, wytwarzaniu kompleksu otwartego, syntezie naprawczej oraz koordynacji składowych etapów naprawy.

**XPC** tworzy kompleks z czynnikiem hHR23B podczas rozpoznania uszkodzenia w GGR. hHR23B stymuluje aktywność XPC *in vitro*, prawdopodobnie w sposób bardziej strukturalny niż katalityczny, jako że domena hHR23B o długości 54 aa wiążąca XPC jest wystarczająca do tego, aby je aktywować [41]. hHR23B występuje w komórkach ssaków liczniej niż białko XPC oraz hHR23A, homolog hHR23B występujący w komórce głównie w formie niezwiązanej [41, 66]. hHR23A może zastępować hHR23B w wiązaniu i stymulowaniu białka XPC *in vitro* [37]. Czynniki hHR23B oraz hHR23A zawierają fragment ubikwitynowy w częściach *N*-terminalnych łańcucha aminokwasowego [41, 66]. Kompleks XPC-hHR23B oraz samo białko XPC wykazują podobny stopień powinowactwa do uszkodzonego promieniowaniem UV, DNA jedno- i dwuniciowego [75]. XPC-hHR23B jest pierwszym czynnikiem, który działa w GGR, nawet przed XPA oraz RPA i włącza kolejne białka do kompleksu naprawczego [75].

**Kompleks TFIIH** bierze udział w transkrypcji polimerazy RNA II, w obu szlakach NER oraz regulacji cyklu komórkowego [71]. Jego składowe XPB i XPD wykazują aktywność ATP-azy zależnej od DNA oraz helikazy [14]. Dzięki właściwości helikazy zależnej od ATP TFIIH bierze udział w tworzeniu kompleksu otwartego, rozciągającego się na długość od 20 do 30 par zasad [16]. Kompleks kinazowy zależny od cykliny (CAK) fosforyluje domenę C-końcową dużej podjednostki polimerazy RNA II, dzięki czemu może ona brać udział w regulacji cyklu komórkowego oraz w inicjacji transkrypcji [71]. Podjednostki p34 i p44 zawierają motyw palca cynkowego oraz mają zdolność wiązania DNA [4]. Kompleks rdzeniowy składa się z podjednostek: p34, p44, p52, p62, i XPB. XPD jest związany zarówno z rdzeniem TFIIH, jak i z kompleksem CAK [70].

**XPA** odgrywa kluczową rolę w początkowych etapach zarówno szlaku GGR, jak i TCR [44]. Jest białkiem wiążącym DNA, wykazującym preferencje przyłączania do uszkodzonego DNA [44, 50]. XPA ma strukturę palca cynkowego, która zwiększa powinowactwo do wiązania DNA [44]. XPA wykazuje szczególnie silne powinowactwo do uszkodzonego DNA o wysokim stopniu zniekształcenia struktury helisy [12]. Białko to łączy inne czynniki kompleksu naprawczego, ERCC1, XPF, podjednostki p32, p70 białka RPA oraz czynnik TFIIH [70, 85]. XPA występuje w komórce w formie wolnej jako homodimer, natomiast w kompleksie z RPA – jako RPA-XPA2 [98]. Sugeruje to ważną rolę dimeryzacji XPA w etapie rozpoznania uszkodzenia NER. Wysoki poziom tego białka nie jest niezbędny dla prawidłowego działania NER w komórce, ponieważ dopiero obniżenie poziomu tego białka poniżej 10% powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu NER [44].

**RPA** jest białkiem wiążącym jednoniciowy DNA i składa się z 3 podjednostek. Podjednostka p70 jest głównie odpowiedzialna za wiązanie DNA, chociaż pozostałe podjednostki również wykazują taką zdolność [8]. W NER całkowite otwarcie kompleksu naprawczego wokół uszkodzonego DNA wymaga białka RPA, które stabilizuje ten kompleks przez związanie z nieuszkodzoną nicią DNA [8, 16, 18].

Mutacje w genach kodujących białka NER mogą prowadzić do powstawania szeregu schorzeń. Z brakiem NER bądź z zaburzeniami w jego funkcjonowaniu związane są choroby genetyczne, głównie neurologiczne oraz nowotwory wynikające z nadwrażliwości skóry na światło słoneczne. Korelacja genotyp-fenotyp w schorzeniach XP i pochodnych może zostać podzielona ze względu na mutacje genów z określonych grup komplementacyjnych oraz obecność nowotworu skóry i/lub zaburzeń neurologicznych (tabela 1).

TABELA 1. Korelacja genotyp-fenotyp w schorzeniach *xeroderma pigmentosum* i pochodnych (oryginalne)

Grupa komplementacyjna	Mutacja w genie	Nowotwór skóry	Fenotyp
A	XPA	+	XP
B	ERCC3	+	XP/CS
B	ERCC3	–	TTD
C	XPC	+	XP
D	ERCC2	+	XP
D	ERCC2	+	XP/CS
D	ERCC2	+	XP/TTD
D	ERCC2	–	TTD
D	ERCC2	–	COFS
E	XPE	+	XP
F	ERCC4	+	XP
G	ERCC5	+	XP oraz XP z objawami zaburzeń neurologicznych
G	ERCC5	+	XP/CS

## ROLA NER W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO I APOPTOZIE

Uszkodzenia usuwane przez NER związane są bezpośrednio z blokowaniem transkrypcji i replikacji, co w dalszej kolejności może wpływać na regulację cyklu komórkowego oraz na indukcję apoptozy [79]. Białko Rad3, związane z recesywną autosomalną chorobą dziedziczną, *ataxia telangiectasia* (ATR), jest jednym z głównych białek indukowanych uszkodzeniami DNA spowodowanymi przez promieniowanie UV. W przeciwieństwie do zmutowanego białka występującego w *ataxia telangiectasia* (ATM), które jest związane z odpowiedzią na uszkodzenia wywoływane przez promieniowanie jonizujące, białko ATR odpowiada na zatrzymanie widełek replikacyjnych [28]. ATR wiąże się bezpośrednio z 6–4 fotoproduktami, co powoduje aktywację jego właściwości kinazowych [83]. Po aktywacji, ATR reguluje cykl komórkowy, co może prowadzić do jego zatrzymania w fazie G1 i G2 oraz opóźnieniu fazy S [33]. ATR może fosforylować serie różnych substratów, w tym p53 oraz kinazę Chk1. Etapy te kończą się zatrzymaniem cyklu komórkowego poprzez zahamowanie transkrypcji genów odpowiedzialnych za jego postęp, co daje systemowi NER dodatkowy czas na usunięcie fotoproduktów UV, które mogą zatrzymywać replikację DNA [83].

Polimeraza poliADP-rybozy 1 (PARP-1) może odgrywać ważną rolę w TCR [99]. Po przyłączeniu do miejsca uszkodzenia PARP-1 zaczyna ADP-rybozylację wielu białek jądrowych, włączając histony oraz samorybozylację [49]. Proces ten bezpośrednio wpływa na zdolności naprawcze komórki. PARP-1 zmniejsza szybkość elongacji transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA II, która odsuwa się od miejsca uszkodzenia, gdy PARP-1 ulegnie automodyfikacji [87]. Aktywność PARP-1 hamuje czynniki transkrypcyjne, zapobiegając ich wiązaniu z DNA, co wskazuje, że poliADP-rybozylacja negatywnie reguluje transkrypcję polimerazy RNA II, która przyłącza się do sekwencji promotorowej w formie hipofosforylowanej (IIa) [99]. Czynniki TFIIH wykazuje aktywność kinazy odpowiedzialnej za fosforylację domeny C-końcowej większej podjednostki polimerazy RNA II, która zaraz po tym opuszcza miejsce promotorowe i zaczyna etap elongacji już jako forma hiperfosforylowana (IIo) [99]. Komórki mające defekt we wznowianiu procesu syntezy RNA po powstaniu uszkodzeń DNA spowodowanych przez promieniowanie UV, tj. komórki ze zmutowanym białkiem CSB, wykazują akumulację formy IIo podczas ekspozycji na promieniowanie UV, czego nie obserwuje się u komórek z funkcjonalnym białkiem CSB [52, 68]. CSB bierze udział w degradacji zatrzymanych kompleksów transkrypcyjnych, co pozwala na usuwanie uszkodzeń oraz na powtórne rozpoczęcie elongacji transkrypcji [68].

Niskie dawki promieniowania UV prowadzą do indukcji mechanizmów ochronnych w komórkach, włączając w to zatrzymanie cyklu komórkowego oraz naprawę uszkodzeń DNA, zaś wysokie dawki promieniowania przyspieszają proces apoptozy [48]. Obniżenie poziomu transkrypcji przez działanie czynników uszkadzających DNA jest jednym z pierwszych sygnałów dla jej indukcji [15]. W komórkach defektywnych w systemy usuwające uszkodzenia DNA w nici transkrybowanej aktywnych genów, w stosunku do komórek ze sprawnym TCR, tempo apoptozy wzrasta, nawet jeśli zostały



one poddane działaniu niskich dawek promieniowania UV. Sugeruje to, że zdolność do usuwania uszkodzeń z aktywnych genów jest niezbędna dla wydajnej syntezy RNA oraz przeżycia komórki [51]. Oprócz usuwania uszkodzeń DNA kompleks naprawczy może inicjować apoptozę, gdy liczba nagromadzonych uszkodzeń jest bardzo duża i zagraża życiu komórki [13]. NER jest regulowany we wczesnych etapach apoptozy przez białko p53 w komórkach z uszkodzonym DNA [23]. Ta wczesna regulacja występuje jako wynik pozytywnie kontrolowanej transkrypcji genów *XPC* oraz *p48* przez białko p53 [1]. Odkąd stwierdzono, że komórki z niedoborem białka p53 (syndrom Li-Fraumeni) są dużo mniej wydajne w wiązaniu czynników XPC oraz TFIIH do miejsc uszkodzeń CPDs, białko p53 wydaje się być niezbędne dla efektywnego działania kompleksu naprawczego NER [2]. Wyniki badań nad zmniejszeniem zdolności naprawczej komórek ze zmutowanym białkiem p53 wykazały, jak ważną rolę odgrywa ten czynnik w ułatwianiu dostępu białek systemu NER do miejsca uszkodzenia [69]. Oprócz regulacji transkrypcji genów uczestniczących w szlaku GGR, p53 odgrywa też rolę w szlaku TCR, o czym świadczy oddziaływanie tego białka z czynnikami XPB, XPD czy CSB [2, 91].

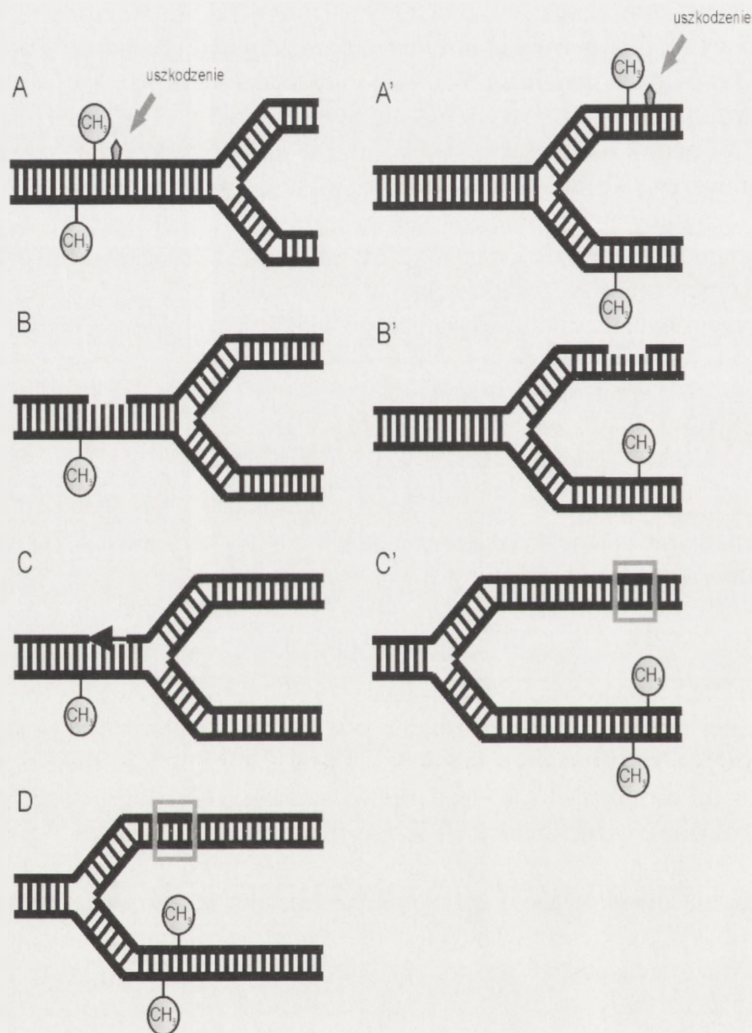
## INNE ASPEKTY NER

NER wpływa również na postreplikacyjną metylację DNA oraz jest silnie zależny od nukleosomalnej struktury chromatyny.

### NER a metylacja

Uszkodzenia DNA oraz ich naprawa mogą prowadzić do zmian we wzorze metylacji DNA, a to z kolei może powodować zmiany w ekspresji genów. Wzory metylacji rodzicielskiego DNA są zachowywane podczas replikacji, przez co metylacja nici potomnych zachodzi w miejscach metylacji nici rodzicielskich [17, 81]. Ten mechanizm pozwala na przekazanie wzoru metylacji DNA do komórek potomnych. U ssaków bezpośrednio po replikacji 5'-metylocytozyna jest obecna tylko w jednej nici. Nowo powstałe nici zostają zmetylowane przez metylazy. Enzymy te rozpoznają hemimetylowane DNA i dodają grupę metylową do nici niezmetrylowanej zaraz po zakończeniu syntezy DNA. Ważnym aspektem jest to, czy wprowadzana do DNA, przez syntezę naprawczą związaną z NER, nowa cytozyna może zostać właściwie zmetylowana. W ludzkich fibroblastach poddanych działaniu promieniowania UV, czy też N-metylo-N-nitrozomocznika metylacja deoksycytyny wprowadzonej podczas syntezy naprawczej zachodzi powoli i niekompletnie [40]. W komórkach w logarytmicznej fazie wzrostu wytwarzanie 5'-metylocytozyny, związane z syntezą naprawczą NER, jest szybsze i bardziej obszerne, aczkolwiek nie jest na tym samym poziomie w porównaniu z komórkami replikującymi nieuszkodzone DNA. Jeśli uszkodzona zasada znajduje się przed widełkami replikacyjnymi w pobliżu miejsca metylacji, usuwana jest przez system NER, w wyniku czego jedna z dwóch potomnych cząsteczek DNA nie zostanie zmetylowana i nastąpi zaburzenie wzoru metylacji. Podobny efekt występuje, gdy uszkodzona zostaje

nić rodzicielska zaraz po zakończeniu procesu replikacji (ryc. 3). Metylacja cytozyny w komórkach ssaków jest bezpośrednio związana z obecnością różnego typu uszkodzeń w DNA. Przykładowo zróżnicowany poziom kancerogenów chemicznych hamuje transfer grup metylowych z S-adenozylometioniny do hemimetylowanego DNA w reakcji



RYCINA 3. Zmiany wzoru metylacji w NER. Po lewej stronie schematu pokazana jest naprawa uszkodzenia bezpośrednio przed widelkami replikacyjnymi: A – naprawa jest zapoczątkowana w pobliżu sekwencji metylowanej; B – metylowana zasada zostaje usunięta; C – usunięta zasada zostaje zastąpiona zasadą niemetylowaną; D – replikacja tego regionu przed dokonaniem metylacji może powodować powstawanie niemetylowanego duplesku DNA. Druga część hemimetylowanego duplesku DNA podlega metylacji. Po prawej stronie schematu pokazana jest naprawa uszkodzonego DNA w pobliżu sekwencji zmetylowanej, bezpośrednio po replikacji. A', B' – wycięcie uszkodzenia przed zmetylowaniem nici potomnej; C' – brak zmetylowania w nici znajdującej się w części duplesku DNA, w której nastąpiła naprawa, która nie jest substratem dla metylazy (modyfikacje wg [25])

katalizowanej *in vitro* za pomocą metylotransferazy pochodzącej ze śledziona mysiej [94]. Niektóre kancerogeny bezpośrednio modyfikują i inaktywują metylotransferazę, wskutek czego DNA zawierające miejsca z utraconymi zasadami ma zmniejszoną zdolność do przyłączania grup metylowych. Wynika stąd, że czynniki uszkadzające mogą zmieniać wzór metylacji 5'-metylocytozyny za pomocą różnych mechanizmów.

U ssaków obszary genomu zawierające geny są bogate w dinukleotydy CpG, których cytozyna może być zmetylowana, w zależności od stanu aktywności transkrypcyjnej tego obszaru [43, 67]. Podobnie jak w przypadku replikacji, wzór metylacji, a więc wzór determinujący ekspresję genów, może zostać zmieniony podczas NER.

### NER a chromatyna

Informacja genetyczna ma w komórkach eukariotycznych postać chromatyny, czyli kompleksu DNA, histonów i innych białek. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, zbudowany z oktameru histonowego (centralny tetramer [H3/H4]<sub>2</sub> i dwa peryferyjne dimery [H2A/H2B]), wokół którego owinięte jest DNA o długości 146 par nukleotydów. Pomiędzy kolejnymi nukleosomami znajduje się, wrażliwy na działanie nukleaz, DNA łącznikowy o zmiennej długości (10–90 par zasad), który może oddziaływać z histonem H1 lub innymi niehistonowymi białkami chromatyny [32, 97]. Aby DNA stał się dostępny dla działania kompleksów enzymatycznych uczestniczących w replikacji, rekombinacji czy naprawie DNA, ta naturalna bariera komórkowa musi zostać przez te kompleksy pokonana.

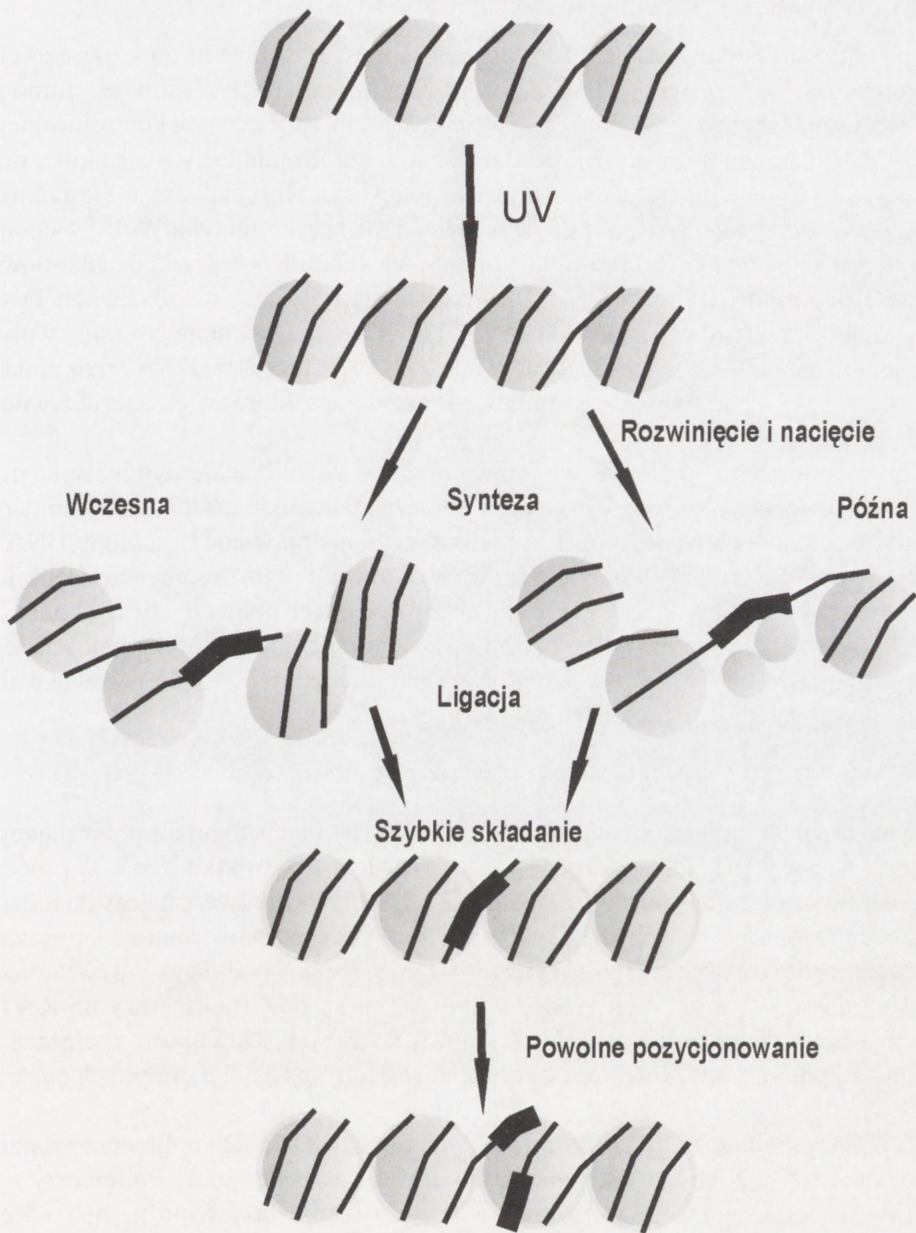
W komórkach eukariotycznych wyróżnia się dwie główne rodziny enzymów modyfikujących chromatynę, czyniących ją bardziej dostępną dla kompleksów biorących udział we wszystkich procesach związanych z DNA [21]. Białka przynależne do pierwszej rodziny wprowadzają zmiany kowalencyjne histonów, gdzie fosforylacja, acetylacja, metylacja, ubikwitynacja, biotynylacja i mono-ADP-rybozylacja histonów wpływa na ich oddziaływania z innymi czynnikami czy DNA [21]. Druga rodzina składa się z kompleksów zależnych od ATP modelujących chromatynę, charakteryzujących się zdolnością do wiązania zmodyfikowanych histonów/nukleosomów oraz rozerwaniu wiązania histon-DNA w rdzeniu nukleosomowym, w środowisku zależnym od ATP [53]. Wynika stąd, że modyfikacje kowalencyjne histonów odgrywają kluczową, dynamiczną rolę w odnajdywaniu i zatrzymywaniu modelujących kompleksów zależnych od ATP i następnie ułatwianiu dostępu do miejsc uszkodzeń czynnikom uczestniczącym w naprawie DNA. Wskazuje to na kluczową rolę modyfikacji histonu/chromatyny w procesach naprawy DNA.

Podatność DNA na uszkodzenia związana jest ze stopniem upakowania chromatyny, w szczególności zaś z jej strukturą nukleosomalną. Poziom adduktów indukowanych przez czynniki chemiczne oraz promieniowanie UV jest wyższy w DNA łącznikowym niż w DNA rdzeniowym. Podczas naprawy uszkodzeń spowodowanych przez promieniowanie UV następuje zmiana pozycji nukleosomów. Synteza naprawcza DNA zachodzi zarówno w DNA łącznikowym, jak i rdzeniowym, aczkolwiek początkowo zachodzi szybciej w DNA łącznikowym. DNA podlegające naprawie znajduje się w różnych stanach, związanych z tymczasowymi zmianami w strukturze nukleosomów

[93]. Wyniki szeregu badań sugerują, że synteza naprawcza nie zachodzi losowo, lecz w określonych miejscach rdzenia nukleosomu [96]. Podczas wczesnej, zachodzącej szybko fazy naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów w chromatynie przebiega preferencyjnie w pobliżu końca 5' rdzenia nukleosomu, natomiast w pobliżu końca 3' naprawa zachodzi w mniejszym stopniu, pozostawiając nienaruszony środkowy region rdzenia [59]. Po pewnym czasie synteza naprawcza zachodzi już losowo, co sugeruje powolne przemieszczanie się histonów rdzenia wzdłuż DNA na odległość około 50 par zasad zaraz po zakończeniu naprawy [59, 93, 96].

Model zmian w konformacji nukleosomów oraz w organizacji struktury podczas naprawy przez wycinanie nukleotydów został przedstawiony na rycinie 4. Brak innych aspektów metabolizmu DNA, takich jak transkrypcja czy replikacja, którym towarzyszy rozwinięcie struktury chromatyny sugeruje, że specyficzne rozpoznanie uszkodzenia przez białka NER prowadzą do rozluźnienia włókien chromatyny [59, 93]. Dostęp kompleksu naprawczego do miejsc uszkodzeń ułatwiony jest przez specyficzne rozmieszczenie uszkodzeń w DNA ułożonego w nukleosomach. Takie zmiany struktury nukleosomów podlegają różnym mechanizmom podczas wczesnych i szybkich oraz późniejszych i wolniejszych etapów naprawy. Po ligacji DNA jest szybko układane wewnątrz struktury nukleosomu, aczkolwiek układanie histonów rdzenia zachodzi powolnie z powodu formowania włókien chromatynowych w struktury wyższego rzędu [59, 93].

Do tej pory poznana została tylko rola acetylacji histonów w NER. Odkąd stwierdzono, że te same reszty lizyny H3 i H4 są acetylowane podczas transkrypcji i NER, sugeruje się, że modyfikacje histonów mogą być decydujące przy wyborze szlaku NER przez komórkę, pomiędzy TCR i GGR. Działanie kwasu masłowego, inhibitora deacetylaz histonów (HDACs) stymuluje działanie początkowych etapów NER *in vivo*, korelowane ze zwiększeniem poziomu acetylacji histonu H4 [74]. Wyniki tych samych autorów pokazują, że synteza naprawcza w komórkach ssaków następująca po działaniu promieniowania UV jest znacząco wzmocniona w hiperacetylowanych pojedynczych nukleosomach, zaś nie jest wynikiem zwiększenia uszkodzeń wywołanych tym promieniowaniem w hiperacetylowanej chromatynie. Jedną z acetylotransferaz histonów jest białko GCN5, wchodzące między innymi w skład kompleksu transkrypcyjnego TFIIIC. Innym składnikiem tego kompleksu jest białko SAPI30, wykazujące silną homologię z podjednostką p127 białka UV-DDB. Stwierdzono, że czynnik TFIIIC preferencyjnie wiąże się z chromatyną uszkodzoną przez promieniowanie UV i katalizuje acetylację histonów w miejscu uszkodzenia [10]. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach pokazują, że promieniowanie UV prowadzi do zwiększenia poziomu acetylacji lizyny 9 i 14 histonu H3 *in vivo* [3]. Odkąd wiadome jest, że TFIIIC jest koaktywatorem transkrypcji i może on być głównie związany z TCR, interesująca jest odpowiedź na pytanie, czy acetylacja H3 jest częściowo związana z TCR, a acetylacja histonu H4 z GGR? Dodatkowo jeśli te same reszty lizyny histonów H3 i H4 są acetylowane podczas transkrypcji, to czy w komórce potrzebna jest dodatkowa modyfikacja histonów dla dokonania wyboru pomiędzy transkrypcją a szlakami NER, w szczególności GGR?



RYCINA 4. Zmiany w strukturze chromatyny podczas naprawy przez wycinanie nukleotydów (modyfikacje wg [25])

## Heterogenność NER

Preferencyjna naprawa nici transkrybowanej sprawia, że mutacje znacznie częściej wywoływane są przez uszkodzenia nici sensownej niż nici antysensownej, mimo że obie nici uszkodzane są z podobną częstością. Różne obszary genomu kontrolowanego przez GGR naprawiane są z różną wydajnością. Uszkodzenia usuwane są kilka razy wolniej z DNA znajdującego się w skondensowanej heterochromatynie, w stosunku do DNA zawierającego geny znajdujące się w rozluźnionej euchromatynie [9, 19]. Genomy ssaków zawierają regiony bogate w powtórzone sekwencje DNA. Uszkodzenia spowodowane promieniowaniem UV są wydajnie naprawiane w obszarach DNA zawierających takie powtórzenia [5]. Wyniki tych badań pozwalają wyjaśnić wpływ promieniowania UV na zwiększenie wydajności NER w tego typu DNA przez zmianę konformacji DNA bądź poprzez stymulowanie czynników, które zwiększają aktywność działania białek NER [5].

Również odmienne preferencje naprawy przez wycinanie nukleotydów występują w różnych regionach pojedynczego genu. W genie reduktazy dihydrofolianowej komórek jajowych chomika chińskiego (CHO) preferencyjnie naprawiane są regiony DNA w końcu 5' oraz flankujących go sekwencji. Wydajność w tym fragmencie DNA jest dużo wyższa niż w regionach w górę genu oraz w regionach położonych przy końcu 3'. Wyniki tych badań sugerują polarność NER, ze zmniejszającą się efektywnością tego systemu naprawczego w niektórych regionach genu w kierunku 5' → 3', porównywalną z taką, jaka występuje w regionach niekodujących [29].

## Synteza DNA na uszkodzonej matrycy

Synteza DNA na uszkodzonej matrycy (TLS) jest mechanizmem pozwalającym komórce na powielanie materiału genetycznego zawierającego uszkodzenia. W procesie tym uczestniczą specjalistyczne polimerazy DNA, których większość należy do rodziny polimeraz Y działających wolniej i z mniejszą dokładnością w porównaniu z polimerazami uczestniczącymi w replikacji [64]. Wyróżnia się dwie rodziny polimeraz Y u *Escherichia coli* (polimerazy IV i V), dwie u *Saccharomyces cerevisiae* (polimerazy  $\eta$  i Rev1) i cztery w komórkach ssaków (polimerazy  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  i Rev1). Dodatkowo, należąca do rodziny B, polimeraza  $\zeta$  również odgrywa ważną rolę w TLS w komórkach eukariotycznych [47].

Konserwatywna struktura centrum aktywnego dwóch trzecich polimeraz z rodziny Y znajduje się w N-końcu sekwencji aminokwasowej tych białek. Polimerazy z tej rodziny umiejscowione są w jądrze i podczas trwania fazy S pol $\eta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$  i Rev1 przemieszczają się w okolicę kompleksu replikacyjnego [38]. Podczas replikacji białka te w postaci wolnej obecne są w środowisku, w którym zachodzi proces powielania DNA. Ten stan może sugerować, że komórka może być narażona na włączenie do procesu replikacji polimerazy o niskiej dokładności działania, jednak w normalnych warunkach nie jest prawdopodobne, aby polimerazy replikujące o wysokiej dokładności mogły zostać zastąpione przez inne polimerazy [42].

Najbardziej znaną polimerazą TLS jest pol $\eta$  występująca w komórkach ssaków, której niedobór wywołuje odmianę *xeroderma pigmentosum* (XP-V) o zwiększonej podatności na nowotwory skóry [55]. Większość pacjentów z XP jest upośledzonych w usuwaniu uszkodzeń spowodowanych promieniowaniem UV za pomocą NER, zaś około 20% z nich, niemających tego defektu, wykazuje zmniejszoną zdolność replikacji DNA po działaniu UV. *In vitro* DNA zawierający dimery pirymidynowe pol $\eta$  replikuje równie wydajnie i dokładnie jak nieuszkodzony DNA [56]. Ze względu na niską procesywność pol $\eta$  jest prawdopodobne, że odłącza się ona zaraz po ominięciu uszkodzenia. Komórki XP-V mają podwyższoną częstość mutacji wywołanych UV, co wskazuje na rolę pol $\eta$  w ustanawianiu niskiego poziomu mutacji w normalnych komórkach poddanych działaniu UV [54]. Jest wielce prawdopodobne, że w przypadku braku pol $\eta$  podczas TLS wykorzystywane są inne polimerazy bądź kombinacja polimeraz tego szlaku. Ze względu, że są one mniej efektywne niż pol $\eta$ , może to prowadzić do nagromadzenia mutacji w komórkach XP-V [78].

Fotoprodukty pirymidynowe nie mogą zostać ominięte przez pol $\eta$  ze względu na to, że wywołują poważniejsze zniekształcenia DNA niż dimery pirymidynowe. Wyniki badań na komórkach ludzkich sugerują, że polimerazami prowadzącymi syntezę pomimo uszkodzeń tego typu są pol $\zeta$  i Rev1, aczkolwiek szczegółowy mechanizm nie został jeszcze poznany [61]. Pol $\zeta$  jest heterodimerem zawierającym podjednostkę katalityczną Rev3 oraz podjednostkę regulatorową Rev7 [63]. Rev1, Rev3 i Rev7 zostały pierwotnie zidentyfikowane w *S. cerevisiae*, a następnie u człowieka. Uczestniczą one w TLS uszkodzeń wywołanych przez wiele czynników uszkadzających DNA [26, 27].

Ważne staje się pytanie, jak polimerazy uczestniczące w TLS są przyłączane do widełek replikacyjnych, podczas gdy zostaje zablokowany kompleks powielający DNA? Ta zamiana polimeraz replikacyjnych na polimerazy TLS jest nazywana przełączaniem polimeraz. Kluczową rolę w tej zamianie odgrywa czynnik PCNA [34]. U *S. cerevisiae*, podczas zatrzymania widełek replikacyjnych spowodowanych uszkodzeniami wywołanymi przez siarczan metylometanu (MMS), ulega ubikwitynacji lizyna 164 w PCNA. Ta ubikwitynacja jest wywołana produktami genów, które do tej pory uważano za związane z replikacją uszkodzonego DNA, aczkolwiek ich rola dotychczas nie jest do końca poznana. Mono-ubikwitynacja PCNA prowadzona jest przez białka E2 Rad6 i E3 Rad18, które następnie przyłączane są do lizyny 63 przez heterodimery E2 Mms2-Ubc13 i E3 Rad5. Mono-ubikwitynacja uważana jest za związaną z procesem TLS, natomiast poli-ubikwitynacja za związaną ze szlakiem usuwania uszkodzeń za pomocą naprawy DNA, niewprowadzającym błędów [34]. Polimerazy  $\eta$ ,  $\iota$  i  $\kappa$  mają klasyczny motyw wiążący PCNA (PIP), aczkolwiek oddziaływania te są bardzo słabe [31, 86]. Mono-ubikwitynacja PCNA zwiększa jego powinowactwo do pol $\eta$  [39, 92]. Wykazano również, że polimerazy  $\iota$ ,  $\kappa$  i Rev1 mają domeny wiążące ubikwitynę (UBDs) i tak jak w przypadku pol $\eta$  i pol $\iota$ , prawdopodobnie także polimerazy  $\kappa$  i Rev1 wiążą ubikwitynę [7]. Kombinowane możliwości wiązania przez polimerazy ubikwitynowanego PCNA za pomocą PIP czy UBDs rozszerza możliwości oddziaływania pomiędzy polimerazami a PCNA, ułatwiając zarówno ich przyłączanie do zatrzymanych widełek replikacyjnych, jak i ich przełączanie.

Podczas ewolucji komórki ssaków wykształciły szeroką gamę specjalnych polimeraz uczestniczących w TLS pojedynczo czy współdziałających ze sobą do omijania różnych

typów uszkodzeń DNA. Ich brak bądź osłabione działanie pociąga za sobą szeroko idące konsekwencje prowadzące do ciężkich schorzeń, związanych również z nieprawidłowym funkcjonowaniem NER.

## UWAGI KOŃCOWE

Poznanie szlaków naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów pozwoli w przyszłości pomagać w diagnozowaniu oraz przy wykorzystaniu terapii genowej leczyć choroby wywołane mutacjami w genach kodujących białka uczestniczące w tym typie naprawy. Aktualna wiedza jest jeszcze daleka od tego, żeby zrozumieć złożoność procesów zachodzących w komórce z uszkodzonym DNA. Identyfikowane są geny, które podlegają ekspresji w sytuacji związanej ze stresem spowodowanym uszkodzeniami DNA. Służy to do poznania odpowiedzi komórki, uzależnionych od rodzaju uszkodzenia DNA, w szczególności odnoszących się do indukcji naprawy oraz genów związanych z apoptozą wywołaną uszkodzeniami spowodowanymi przez promieniowanie UV. Szlaki naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów w określonych warunkach charakteryzuje zdolność niezależnego działania od innych reakcji komórkowych. Indywidualne czynniki odpowiedzi komórkowej pełnią nie tylko rolę opóźniającą cykl komórkowy, ale również bezpośrednio bądź pośrednio oddziałują z naprawą. To jak te czynniki rozpoznają uszkodzenia w DNA po to, by wybrać drogę naprawy DNA czy też apoptozy, pozostaje do zbadania. Do zbadania pozostaje również, gdzie umiejscawia się uszkodzenie wewnątrz kompleksu polimerazy RNA oraz jak wpływa ono na zatrzymanie, czy też na omijanie uszkodzenia przez enzym. Oprócz odpowiedzi na te pytania należy również odpowiedzieć, jakie zmiany konformacyjne zachodzą w polimerazie RNA w zależności od typu uszkodzenia, jak również czy polimeraza RNA powraca do miejsca zatrzymania po zakończeniu naprawy i czy ten powrót wymaga oddziaływania dodatkowych białek. Poznanie tych zagadnień jest niezbędne dla całkowitego poznania związku naprawy DNA z transkrypcją i roli tego sprzężenia dla właściwego funkcjonowania komórki.

Te aspekty odpowiedzi na uszkodzenia DNA muszą zostać w przyszłości wyjaśnione dla lepszego zrozumienia odpowiedzi komórkowej na czynniki genotoksyczne. Wiedza ta może pozwolić na rozwinięcie strategii mających na celu ochronę przeciwnowotworową oraz chemioterapię. Wyniki pochodzące z sekwencjonowania genomu człowieka są także ogromnym źródłem informacji, które mogą pomóc w zrozumieniu, jak ewoluowały systemy obrony organizmów w odpowiedzi na oddziaływanie na DNA czynników środowiskowych i komórkowych.

## LITERATURA

- [1] ADIMOOLAM S, FORD JM. p53 and DNA damage-inducible expression of the *xeroderma pigmentosum* group C gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 12985–12990.
- [2] ADIMOOLAM S, FORD JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2003; **2**: 947–954.



- [3] ALLISON SJ, MILNER J. Loss of p53 has site-specific effects on histone H3 modification, including serine 10 phosphorylation important for maintenance of ploidy. *Cancer Res* 2003; **63**: 6674–6679.
- [4] ARAUJO SJ, TIRODE F, COIN F, POSPIECH H, SYVAOJA JE, STUCKI M, HUBSCHER U, EGLY JM, WOOD RD. Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev* 2000; **14**: 349–359.
- [5] BALAJEE AS, BOHR VA. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 2000; **250**: 15–30.
- [6] BERNEBURG M, LEHMANN AR. *Xeroderma pigmentosum* and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv Genet* 2001; **43**: 71–102.
- [7] BIENKO M, GREEN CM, CROSETTO N, RUDOLF F, ZAPART G, COULL B, KANNOUCHE P, WIDER G, PETER M, LEHMANN AR, HOFMANN K, DIKIC I. Ubiquitin-binding domains in translesion synthesis polymerases. *Science* 2005; **310**: 1821–1824.
- [8] BINZ SK, SHEEHAN AM, WOLD MS. Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**: 1015–1024.
- [9] BOHR VA. Gene specific DNA repair. *Carcinogenesis* 1991; **12**: 1983–1992.
- [10] BRAND M, MOGGS JG, OULAD-ABDELGHANI M, LEJEUNE F, DILWORTH FJ, STEVENIN J, ALMOUZI G, TORA L. UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIH complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *EMBO J* 2001; **20**: 3187–3196.
- [11] BREGEON D, DODDRIDGE ZA, YOU HJ, WEISS B, DOETSCH PW. Transcriptional mutagenesis induced by uracil and 8-oxoguanine in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 2003; **12**: 959–970.
- [12] CAMENISCH U, DIP R, SCHUMACHER SB, SCHULER B, NAEGELI H. Recognition of helical kinks by *xeroderma pigmentosum* group A protein triggers DNA excision repair. *Nat Struct Mol Biol* 2006; **13**: 278–284.
- [13] CHAO C, SAITO S, KANG J, ANDERSON CW, APPELLA E, XU Y. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J* 2000; **19**: 4967–4975.
- [14] CHEN J, LAROCHELLE S, LI X, SUTER B. Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* 2003; **424**: 228–232.
- [15] CHIGANCAS V, BATISTA LF, BRUMATTI G, AMARANTE-MENDES GP, YASUI A, MENCK CF. Photorepair of RNA polymerase arrest and apoptosis after ultraviolet irradiation in normal and XPB deficient rodent cells. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 1099–1107.
- [16] COSTA RMA, CHIGANÇAS V, Da SILVA GALHARDO R, CARVALHO H, MENCK CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 2003; **85**: 1083–1099.
- [17] COUILLARD J, DEMERS M, LAVOIE G, St-PIERRE Y. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **342**: 1233–1239.
- [18] DIP R, CAMENISCH U, NAEGELI H. Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**: 1409–1423.
- [19] DRURY MD, SKOGEN MJ, KMIK EB. A tolerance of DNA heterology in the mammalian targeted gene repair reaction. *Oligonucleotides* 2005; **15**: 155–171.
- [20] EVANS E, MOGGS JG, HWANG JR, EGLY JM, WOOD RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* 1997; **16**: 6559–6573.
- [21] FISCHLE W, WANG Y, ALLIS CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 172–183.
- [22] FITCH ME, NAKAJIMA S, YASUI A, FORD JM. *In vivo* recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem* 2003; **278**: 46906–46910.
- [23] FORD JM. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: Another role for p53. *Mutat Res* 2005; **577**: 195–202.
- [24] FRIEDBERG EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**: 22–33.
- [25] FRIEDBERG EC, WALKER GC, SIEDE W, WOOD RD, SCHULTZ RA, ELLENBERGER T. Heterogeneity of nucleotide excision repair in eukaryotic genomes. *DNA Repair and Mutagenesis* Washington, ASM Press 2006: 351–378.
- [26] GIBBS PEM, WANG XD, LI Z, McMANUS T, MCGREGOR G, LAWRENCE CW, MAHER VM. The function of the human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* REV1 is required for mutagenesis induced by ultraviolet light. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4186–4191.
- [27] GIBBS PEM, MCGREGOR WG, MAHER VM, NISSON P, LAWRENCE CW. A human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* REV3 gene, which encodes the catalytic subunit of DNA polymerase  $\zeta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6876–6880.

- [28] GOODARZI AA, BLOCK WD, LEES-MILLER SP. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 2003; **5**: 393–411.
- [29] HANAWALT PC. Heterogeneity of DNA repair at the gene level. *Mutat Res* 1991; **247**: 203–211.
- [30] HANAWALT PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 2002; **21**: 8949–8956.
- [31] HARACSKA L, JOHNSON RE, UNK I, PHILLIPS B, HURWITZ J, PRAKASH L, PRAKASH S. Physical and functional interactions of human DNA polymerase  $\epsilon$  with PCNA. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 7199–7206.
- [32] HASSA PO, HOTTIGER MO. An epigenetic code for DNA damage repair pathways? *Biochem Cell Biol* 2005; **83**: 270–285.
- [33] HELT CE, CLIBY WA, KENG PC, BAMBARA RA, O'REILLY MA. *Ataxia telangiectasia* mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem* 2005; **280**: 1186–1192.
- [34] HOEGE C, PFANDER B, MOLDOVAN GL, PYROLOWAKIS G, JENTSCH S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002; **419**: 135–141.
- [35] HUNTING DJ, GOWANS BJ, DRESLER SL. DNA polymerase delta mediates excision repair in growing cells damaged with ultraviolet radiation. *Biochem Cell Biol* 1991; **69**: 303–308.
- [36] JAWHARI A, LAINE JP, DUBAELE S, LAMOUR V, POTERSZMAN A, COIN F, MORAS D, EGLY JM. p52 Mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31761–31767.
- [37] KAMIONKA M, FEIGON J. Structure of the XPC binding domain of hHR23A reveals hydrophobic patches for protein interaction. *Protein Sci* 2004; **13**: 2370–2377.
- [38] KANNOUCHE P, FERNANDEZ de HENESTROSA AR, COULL B, VIDAL AE, GRAY C, ZICHA D, WOODGATE R, LEHMANN AR. Localization of DNA polymerases  $\eta$  and  $\iota$  to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *EMBO J* 2003; **22**: 1223–1233.
- [39] KANNOUCHE PL, WING J, LEHMANN AR. Interaction of human DNA polymerase  $\eta$  with monoubiquitinated PCNA; a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 2004; **14**: 491–500.
- [40] KASTAN MB, GOWANS BJ, LIEBERMAN MW. Methylation of deoxycytidine incorporated by excision-repair synthesis of DNA. *Cell* 1982; **30**: 509–516.
- [41] KIM B, RYU KS, KIM HJ, CHO SJ, CHOI BS. Solution structure and backbone dynamics of the XPC-binding domain of the human DNA repair protein hHR23B. *FEBS J* 2005; **272**: 2467–2476.
- [42] KING NM, NIKOLAISHVILI-FEINBERG N, BRYANT MF, LUCHE DD, HEFFERNAN TP, SIMPSON DA, HANAOKA F, KAUFMANN WK, CORDEIRO-STONE M. Overproduction of DNA polymerase eta does not raise the spontaneous mutation rate in diploid human fibroblasts. *DNA Rep (Amst)* 2005; **4**: 714–724.
- [43] KLOSE RJ, BIRD AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; **31**: 89–97.
- [44] KOBERLE B, ROGINSKAYA V, WOOD RD. XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair (Amst)* 2006; **5**: 641–648.
- [45] KULAKSIZ G, REARDON JT, SANCAR A. *Xeroderma pigmentosum* complementation group E protein (XPE/DBB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 9784–9792.
- [46] Le PAGE F, KWON EE, AVRUTSKAYA A, GENTIL A, LEADON SA, SARASIN A, COOPER PK. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 2000; **101**: 159–171.
- [47] LEHMANN AR. Translesion synthesis in mammalian cells. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 2673–2676.
- [48] LI G, HO VC. p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 1998; **139**: 3–10.
- [49] LINDAHL T, SATOH MS, POIRIER GG, KLUNGLAND A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 405–411.
- [50] LIU Y, LIU Y, YANG Z, UTZAT C, WANG G, BASU AK, ZOU Y. Cooperative interaction of human XPA stabilizes and enhances specific binding of XPA to DNA damage. *Biochemistry* 2005; **44**: 7361–7368.
- [51] LJUNGMAN M. Recovery of RNA synthesis from the DHFR gene following UV-irradiation precedes the removal of photolesions from the transcribed strand. *Carcinogenesis* 1999; **20**: 395–399.

- [52] LUO Z, ZHENG J, LU Y, BREGMAN DB. Ultraviolet radiation alters the phosphorylation of RNA polymerase II large subunit and accelerates its proteasome-dependent degradation. *Mutat Res* 2001; **486**: 259–274.
- [53] LUSSER A, KADONAGA JT. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* 2003; **25**: 1192–1200.
- [54] MAHER VM, OUELLETTE LM, CURREN RD. Frequency of ultraviolet light-induced mutations is higher in *Xeroderma pigmentosum* variant cells than in normal human cells. *Nature* 1976; **261**: 593–595.
- [55] MASUTANI C, KUSUMOTO R, YAMADA A, DOHMAE N, YOKOI M, YUASA M, ARAKI M, IWAI S, TAKIO K, HANAOKA F. The XPV (*xeroderma pigmentosum* variant) gene encodes human DNA polymerase  $\eta$ . *Nature* 1999; **399**: 700–704.
- [56] MASUTANI C, KUSUMOTO R, IWAI S, HANAOKA F. Accurate translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$ . *EMBO J* 2000; **19**: 3100–3109.
- [57] MEI KWEI JS, KURAOKA I, HORIBATA K, UBUKATA M, KOBATAKE E, IWAI S, HANDA H, TANAKA K. Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6–4 photoproduct. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **320**: 1133–1138.
- [58] MELLON I. Transcription-coupled repair: A complex affair. *Mutat Res* 2005; **577**: 155–161.
- [59] MORALES V, GIAMARCHI C, CHAILLEUX C, MORO F, MARSAUD V, Le RICOUSSE S, RICHARD-FOY H. Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie* 2001; **83**: 1029–1039.
- [60] MOSER J, VOLKER M, KOOL H, ALEKSEEV S, VRIELING H, YASUI A, van ZEELAND AA, MULLENDERS LH. The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair (Amst)* 2005; **4**: 571–582.
- [61] NAKAJIMA S, LAN L, KANNOS, TAKAOM, YAMAMOTO K, EKER AP, YASUI A. UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 46674–46677.
- [62] NAKATSU Y, ASAHINA H, CITTERIO E, RADEMAKERS S, VERMEULEN W, KAMIUCHI S, YEO JP, KHAW MC, SAIJO M, KODO N, MATSUDA T, HOEIJMAKERS JH, TANAKA K. XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem* 2000; **275**: 34931–34937.
- [63] NELSON JR, LAWRENCE CW, HINKLE DC. Thymine–thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase  $\zeta$ . *Science* 1996; **272**: 1646–1649.
- [64] OHMORI H, FRIEDBERG EC, FUCHS RPP, GOODMAN MF, HANAOKA F, HINKLE D, KUNKEL TA, LAWRENCE CW, LIVNEH Z, NOHMI T, PRAKASH L, PRAKASH S, TODO T, WALKER GC, WANG Z, WOODGATE R. The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* 2001; **8**: 7–8.
- [65] PIETRZYKOWSKA I, KRZAWICZ J. Mechanizmy naprawy DNA u bakterii i człowieka. *Kosmos* 1999; **245**: 315–328.
- [66] RAASI S, ORLOV I, FLEMING KG, PICKART CM. Binding of polyubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A. *J Mol Biol* 2004; **341**: 1367–1379.
- [67] ROBERTSON KD, JONES PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 461–467.
- [68] ROCKX DA, MASON R, van HOFFEN A, BARTON MC, CITTERIO E, BREGMAN DB, van ZEELAND AA, VRIELING H, MULLENDERS LH. UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10503–10508.
- [69] RUBBI CP, MILNER J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* 2003; **22**: 975–986.
- [70] SAIJO M, MATSUDA T, KURAOKA I, TANAKA K. Inhibition of nucleotide excision repair by anti-XPA monoclonal antibodies which interfere with binding to RPA, ERCC1, and TFIIH. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 815–822.
- [71] SARKER AH, TSUTAKAWA SE, KOSTEK S, NG C, SHIN DS, PERIS M, CAMPEAU E, TAINER JA, NOGALES E, COOPER PK. Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell* 2005; **20**: 187–198.
- [72] SCHULTZ P, FRIBOURG S, POTERSZMAN A, MALLOWH V, MORAS D, EGLY JM. Molecular structure of human TFIIH. *Cell* 2000; **102**: 599–607.
- [73] SEEBERG E, EIDE L, BJORAS M. The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 391–397.

- [74] SMERDON MJ, LAN SY, CALZA RE, REEVES R. Sodium butyrate stimulates DNA repair in UV-irradiated normal and *xeroderma pigmentosum* human fibroblasts. *J Biol Chem* 1982; **257**: 13441–13447.
- [75] THOMA BS, VASQUEZ KM. Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair. *Mol Carcinog* 2003; **38**: 1–13.
- [76] THOMA BS, WAKASUGI M, CHRISTENSEN J, REDDY MC, VASQUEZ KM. Human XPC-hHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 2993–3001.
- [77] THOREL F, CONSTANTINO A, DUNAND-SAUTHIER I, NOUSPIKEL T, LALLE P, RAAMS A, JASPERS NG, VERMEULEN W, SHIVJI MK, WOOD RD, CLARKSON SG. Definition of a short region of XPG necessary for TFIIH interaction and stable recruitment to sites of UV damage. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 10670–10680.
- [78] TISSIER A, McDONALD JP, FRANK EG, WOODGATE R. Poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev* 2000; **14**: 1642–1650.
- [79] TORNALETTI S. Transcription arrest at DNA damage sites. *Mutat Res* 2005; **577**: 131–145.
- [80] TRIPSIANES K, FOLKERS G, AB E, DAS D, ODIJK H, JASPERS NG, HOEIJMAKERS JH, KAPTEIN R, BOELENS R. The structure of the human ERCC1/XPF interaction domains reveals a complementary role for the two proteins in nucleotide excision repair. *Structure* 2005; **13**: 1849–1858.
- [81] TUREK-PLEWA J, JAGODZINSKI PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005; **10**: 631–647.
- [82] UCHIDA A, SUGASAWA K, MASUTANI C, DOHMAE N, ARAKI M, YOKOI M, OHKUMA Y, HANAOKA F. The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH. *DNA Repair* 2002; **1**: 449–461.
- [83] UNSAL-KACMAZ K, MAKHOV AM, GRIFFITH JD, SANCAR A. Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6673–6678.
- [84] van HOFFEN A, BALAJEE AS, van ZEELAND AA, MULLENDERS LH. Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology* 2003; **193**: 79–90.
- [85] VASQUEZ KM, CHRISTENSEN J, LI L, FINCH RA, GLAZER PM. Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 5848–5853.
- [86] VIDAL AE, KANNOUCHE P, PODUST VN, YANG W, LEHMANN AR, WOODGATE R. PCNA-dependent coordination of the biological functions of human DNA polymerase  $\epsilon$ . *J Biol Chem* 2004; **279**: 48360–48368.
- [87] VISPE S, YUNG TM, RITCHOT J, SERIZAWA H, SATOH MS. A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 9886–9891.
- [88] VISWANATHAN A, DOETSCH PW. Effects of nonbulky DNA base damages on *Escherichia coli* RNA polymerase-mediated elongation and promoter clearance. *J Biol Chem* 1998; **273**: 21276–21281.
- [89] VOLKER M, MONE MJ, KARMAKAR P, van HOFFEN A, SCHUL W, VERMEULEN W, HOEIJMAKERS JH, VAN DRIEL R, van ZEELAND AA, MULLENDERS LH. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo*. *Mol Cell* 2001; **8**: 213–224.
- [90] WALICKA M. DNA repair in the human genome. *Post Biochem* 1994; **40**: 77–85.
- [91] WANG QE, ZHU Q, WANI MA, WANI G, CHEN J, WANI AA. Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2003; **2**: 483–499.
- [92] WATANABE K, TATEISHI S, KAWASUJI M, TSURIMOTO T, INOUE H, YAMAIZUMI M. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J* 2004; **28**: 3886–3896.
- [93] WIDLAK P, PIETROWSKA M, LANUSZEWSKA J. The role of chromatin proteins in DNA damage recognition and repair Mini-review. *Histochem Cell Biol* 2006; **125**: 119–126.
- [94] WILSON VL, JONES PA. Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens *in vitro*. *Cell* 1983; **32**: 239–246.
- [95] WINKLER GS, SUGASAWA K, EKER AP, de LAAT WL, HOEIJMAKERS JH. Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF. *Biochemistry* 2001; **40**: 160–165.

- [96] WOOD A, SCHNEIDER J, SHILATIFARD A. Cross-talking histones: implications for the regulation of gene expression and DNA repair. *Biochem Cell Biol* 2005; **83**: 460–467.
- [97] WOODCOCK CL, GRIGORYEV SA, HOROWITZ RA, WHITAKER N. A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 9021–9025.
- [98] YANG ZG, LIU Y, MAO LY, ZHANG JT, ZOU Y. Dimerization of human XPA and formation of XPA2-RPA protein complex. *Biochemistry* 2002; **41**: 13012–13020.
- [99] ZIEGLER M, OEI SL. A cellular survival switch: poly(ADP-ribosylation) stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays* 2001; **23**: 543–548.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 22.05. 2006 r.*

*Przyjęto: 02.10. 2006 r.*

*Banacha 12/16, 90-237 Łódź*

*e-mail: tomsliw@biol.uni.lodz.pl,*

*januszb@biol.uni.lodz.pl*



# WIELKOŚĆ GENOMÓW JĄDROWYCH I KOMÓREK U ZWIERZĄT: MECHANIZMY RÓŻNICOWANIA ORAZ KONSEKWENCJE FIZJOLOGICZNE I EKOLOGICZNE\*

NUCLEAR GENOME SIZE AND CELL SIZE IN ANIMALS:  
MECHANISMS OF DIFFERENTIATION, PHYSIOLOGICAL  
AND ECOLOGICAL CONSEQUENCES

Jan KOZŁOWSKI<sup>1</sup> i Józefa STYRNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Nauk o Środowisku oraz <sup>2</sup>Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu Instytutu  
Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

*Streszczenie:* Wielkość genomów jądrowych zwierząt różni się tysiące razy i zupełnie nie koreluje ze stopniem złożoności organizmów. Wynika to stąd, iż większość genomu stanowią niekodujące sekwencje powtarzalne. Krótko przypomniano najważniejsze typy i sposoby powstawania tych sekwencji. Przedstawiono hipotezy na temat powstawania tak dużego zróżnicowania ilości niekodującego DNA. Według obecnego stanu wiedzy istnieje łańcuch przyczynowo-skutkowy od ilości DNA poprzez wielkość jądra do wielkości komórek. Ponieważ rozmiary komórek silnie wpływają na tempo metabolizmu i rozwoju, ilość DNA i mechanizmy wpływające na jej zmiany znajdują się także pod silną presją selekcyjną. Zatem zróżnicowanie ilości DNA jest odzwierciedleniem zróżnicowania równowagi mutacyjno-selekcyjnej.

*Słowa kluczowe:* sekwencje powtarzalne, ewolucja wielkości genomu, tempo metabolizmu, tempo rozwoju.

*Summary:* Nuclear genome size differs thousands-fold in animals and does not correlate with their complexity. Such pattern results from domination of non-coding, most often repetitive sequences in genomes. Most common types of repetitive sequences and their origin are mentioned. Then, some hypotheses on the origin of so great variability in the amount of non-coding DNA are presented. According to the present state of knowledge, a cause-and-effect chain exists, from the amount of DNA, through nucleus volume, to cell size. Because cell size affects strongly the metabolic rate and developmental rate, the amount of DNA and mechanisms changing this amount must be also under strong selection pressure. Thus, the variability of DNA amount reflects the variability of mutation-selection balance among organisms.

*Key words:* repetitive sequences, genome size evolution, metabolic rate, developmental rate.

\*Praca była finansowana z subsydium profesorskiego FNP (JK), tematu DS/757/UJ(JK) i DS/IZ/775/UJ(JS).

*Publikację tę dedykujemy  
Śp. Profesorowi Henrykowi Szarskiemu  
jednemu z pionierów badań związków między  
ilością DNA, wielkością komórek i tempem metabolizmu.*

Wprawdzie Jego najśłynniejszy artykuł na ten temat publikowany był w 1970 r. w *Nature* [35], ale już w 1974 r. Profesor omówił obszernie te zagadnienia w pierwszym tomie *Postępów Biologii Komórki* [36].

## WSTĘP

Cała informacja genetyczna, zawarta w chromosomach jakiegoś gatunku lub w DNA mitochondrialnym czy chloroplastowym, nosi nazwę genomu. Badając skład DNA genomu jądrowego stwierdzono, że w chromosomach większości zwierząt można znaleźć zarówno odcinki unikatowe, jak i takie, które powtarzają się wielokrotnie. Struktura genomu organizmów zwierzęcych to mozaika sekwencji kodujących rozmieszczonych na przemian z niekodującymi, niepowtarzalnych na przemian z powtarzającymi się. Bakterie zawierają niewielką ilość (kilka procent) takich sekwencji, jednokomórkowe Eukaryota, takie jak drożdże, zajmują pozycję pośrednią, a wśród Protista i innych organizmów eukariotycznych jest pod tym względem ogromne zróżnicowanie.

Choć zsekwencjonowano dotychczas niewiele genomów, i to organizmów o niewielkiej ilości DNA, liczba funkcjonalnych genów zdaje się dobrze odzwierciedlać stopień złożoności, mierzonej choćby liczbą typów komórek. Inaczej wygląda sprawa z całkowitą ilością DNA. W 1971 roku Thomas [9] zauważył brak korelacji między wielkością genomu jądrowego, mierzoną w pikogramach (pg) lub w milionach par zasad (Mpz) a złożonością organizmów. Ponieważ ilość DNA w haploidalnej komórce nazwano *C-value*, zjawisko to zostało nazwane *C-value paradox* (paradoks wartości C). Rozwój genetyki wyjaśnił całkowicie ten paradoks poprzez stwierdzenie, że ogromna większość materiału genetycznego Eukaryota nie koduje informacji. Znikł więc paradoks wartości C, ale pozostała zagadka wartości C (*C-value enigma* [9]): dlaczego istnieją tak wielkie, nieskorelowane ze złożonością organizmów różnice w ilości niekodującego DNA? A różnice te są rzeczywiście ogromne. Genomy Protozoa pokrywają cały zakres zmienności wartości C u Eukaryota, od ułamka pg do kilkuset pg (z pominięciem ekstremalnej wartości znalezionej dla ameby, powodowanej zapewne silną poliploidyzacją lub błędem pomiarowym) [9]. Zmienność wśród roślin naczyniowych, zwłaszcza okrytozalążkowych jest też ogromna [24]. Metazoa mają zakres wielkości haploidalnego genomu od 0,03 pg u nicienia *Meloidogyne graminicola* do 130 pg u ryby dwudysznej *Protopterus aethiopicus*, ale niewiele ustępują jej płazy ogoniaste (od 10 do 120 pg) [12]. Co interesujące, płazy bezogonowe nie tylko mają mniejsze genomy (wartość C mniej więcej od 1 do 14 pg), ale zakres zmienności prawie nie zachodzi na zakres zmienności wielkości genomów płazów ogoniastych. Inne kręgowce mają genomy mniejsze, z wyjątkiem ryb chrzęstnoszkieletowych, u których zarówno minimalna (ok.



2,5 pg), jak i maksymalna (ok. 17 pg) wartość C jest znaczna [12]. Małe genomy mają ryby kostnoszkieletowe (C od 0,35 do 4,90), a także ptaki (C od 0,97 do 2,16) i ssaki (C od 1,73 do 8,40). Wśród pozostałych Metazoa zakres zmienności w obrębie poszczególnych grup jest spory. Najmniejszy zakres zmienności opisano dotychczas u nicieni, a stosunkowo duży u skorupiaków [12]. Jest charakterystyczne, że dla większości grup systematycznych średnia wielkość genomu jest stosunkowo niewielka, mamy więc do czynienia z mocno prawoskośnymi rozkładami. Jest to szczególnie widoczne w przypadku grup o dużej zmienności wielkości genomów [13].

Wyjaśnienie zagadki wielkości genomów musi obejmować trzy zagadnienia [10]:

(i) mechanizm zmian ilości DNA (rozdz. 2),  
(ii) mechanizm związku między ilością DNA, wielkością jądra i wielkością komórki (rozdz. 3) i

(iii) siły selekcyjne mogące prowadzić do wzrostu lub spadku ilości DNA, a więc konsekwencje wielkości genomów dla cech fizjologicznych i ewentualnie anatomicznych organizmów.

Terminologia związana z badaniami ilości DNA jest ciągle nieuporządkowana [16]. Na potrzeby tej pracy przyjęliśmy, że wartość C oznacza haploidalną ilość DNA (mierzoną w pg lub milionach par nukleotydów), natomiast wymiennie używamy terminów „ilość DNA” lub „wielkość genomu” tam, gdzie nie ma potrzeby określać tych wartości ilościowo. Natomiast termin „wielkość genomu” nie określa liczby funkcjonalnych genów.

## 2. MECHANIZMY PROWADZĄCE DO ZMIANY ILOŚCI DNA U ZWIERZĄT

Synteza nowych cząsteczek DNA odbywa się głównie w wyniku replikacji już istniejących, trzeba więc założyć, iż zwiększenie się zawartości materiału genetycznego zachodziło drogą wielokrotnego podwojenia się, czyli duplikacji sekwencji wyjściowych. Badania nad strukturą genów i kodowanych przez nie białek, a w szczególności rozwinięte w ostatnich latach metody sekwencjonowania czy klonowania DNA oraz metody analiz komputerowych, umożliwiające szybką ocenę podobieństwa między sekwencjami, dostarczają licznych danych świadczących o wspólnym pochodzeniu wielu genów lub ich fragmentów [1,6].

### 2.1. Mechanizmy zwiększania wielkości genomów: duplikacje genów i sekwencji niekodujących

W zwiększaniu ilości materiału genetycznego Eukaryota ważną rolę odgrywają duplikacje genów, zachodzące w wyniku poprzecznych pęknięć chromosomów i łączenia się powstałych fragmentów w odmiennym układzie. Zjawiska takie zachodzą zwykle spontanicznie, ale mogą się nasilać pod wpływem działania czynników mutagennych. Duplikacje mogą też zachodzić na skutek przemieszczania się transpozonów, czyli

ruchomych elementów DNA w chromosomach. Jednym z mechanizmów powstawania duplikacji jest niesymetryczny *crossing over*, spowodowany wzajemnym przesunięciem koniugujących chromosomów w czasie mejozy. Obecność jednej duplikacji sprzyja powstawaniu następnych, gdyż skutek podwojenia identycznych odcinków w chromosomach zwiększają się szanse ich niesymetrycznej koniugacji. Jeżeli proces taki zajdzie wielokrotnie, powstaje szereg, tzw. tandem zduplikowanych genów. Zwielokrotnione odcinki DNA mogą pozostawać razem w chromosomach albo też w wyniku dalszych zmian rozproszyć się w różne miejsca genomu [19,22].

Duplikacja genów może przynosić pewne korzyści ewolucyjne. Na przykład, jeżeli istnieje duże zapotrzebowanie metaboliczne na produkty jakiegoś genu, to wcielenie do genomu wielu identycznych kopii tego genu umożliwi znacznie wydajniejszą syntezę kodowanych przez nie związków. Jeżeli zaś obecność jednego genu wystarcza w zupełności dla utrzymania ważnej życiowo funkcji, to jego druga kopia – jako dodatkowa i w zasadzie zbędna – zostaje wyzwolona spod rygorystycznej presji selekcyjnej i może poprzez mutacje przekształcić się w jakościowo nowy, nieistniejący poprzednio gen. Klasycznym przykładem takiego procesu są rodziny genów kodujących globiny. Np. w genomie ludzkim zakodowanych jest pięć różnych łańcuchów  $\beta$  globiny. Każdy z nich ulega ekspresji na innym etapie rozwoju, od zarodka po dojrzały organizm. Geny te ułożone są tandemowo na 11 chromosomie [19].

Proces duplikacji segmentów genomu obserwuje się także dość często w komórkach organizmów wyższych hodowanych przez kilka pokoleń w obecności związków toksycznych. Podczas barwienia chromosomów można w nich zaobserwować jednorodnie barwiące się fragmenty nieobserwowane wcześniej w komórkach wyjściowych. Struktury te zawierają dużą liczbę kopii segmentów DNA o długości 1 Mb lub dłuższych, w których obrębie znajduje się zazwyczaj gen, którego produkt umożliwia zneutralizowanie efektu czynnika toksycznego wprowadzonego do medium. Te struktury zwane są amplikonami. Amplifikacja zachodzi przez wielokrotną replikację w jednym lub kilku sąsiednich replikonach podczas jednego cyklu komórkowego lub przez niesymetryczny *crossing over*. Zjawisko to obserwuje się często w komórkach nowotworowych, ale można przypuszczać, że podobny proces mógł towarzyszyć powstawaniu w chromosomach regionów zawierających dużą liczbę kopii genów kodujących rRNA czy histony. Należy zaznaczyć, że duplikacje różnych segmentów chromosomów u ludzi mogą być przyczyną chorób, ponieważ takiej duplikacji może towarzyszyć wzrost ekspresji genów położonych w zduplikowanych obszarach.

Do grupy wielokrotnie powtarzających się w genomie odcinków DNA należą, oprócz funkcjonalnych genów, także liczne sekwencje niekodujące, występujące w setkach czy tysiącach kopii. Spośród wielu klas niekodujących sekwencji powtarzających się do najważniejszych należą tandemowe sekwencje satelitarne. Występują one praktycznie u wszystkich organizmów wyższych, stanowiąc niekiedy nawet do połowy DNA chromosomowego. DNA satelitarne występuje głównie w okolicy centromerów, gdzie zajmuje setki tysięcy par zasad, a składa się z rodzin obejmujących tysiące krótkich sekwencji po około 10 pz. DNA satelitarne występuje także w rejonach telomerowych chromosomów [19]. Przez pewien czas istniały wątpliwości co do tego, czy pełni on jakąś funkcję. Obecnie uważa się, że jego rolą jest tworzenie heterochromatyny, a

więc regionów, w których włókno chromatynowe jest silnie skondensowane i które są niezbędne dla poprawnego funkcjonowania chromosomów [23].

Oddzielną klasę sekwencji powtarzających się stanowią minisatelity i mikrosatelity. Są to regiony wykazujące bardzo dużą zmienność, a zmienna liczba tych odcinków może wynikać z błędów (poślizgu) polimerazy w czasie replikacji DNA. Sekwencje minisatelitarne ułożone są w odcinki o długości kilkuset par zasad do ponad 20 kpz i składają się z tandemowo ułożonych sekwencji 9–80 pz. Mikrosatelitami nazywamy powtarzające się odcinki sekwencji o długości jednostki powtarzalności od jednego do kilku nukleotydów i o liczbie powtórzeń, która nie przekracza na ogół kilkudziesięciu nukleotydów.

W genomie zwierzęcym może znajdować się także pewna liczba tzw. pseudogenów, a więc sekwencji nukleotydowych przypominających geny, lecz transkrypcyjnie nieaktywnych. Wyróżnia się dwa rodzaje pseudogenów. Pierwszy z nich powstaje w wyniku duplikacji odcinka DNA w procesie np. niesymetrycznego *crossing over*. W takiej kopii zduplikowanego genu, poprzez mutacje, może dojść do wygaszenia jego ekspresji. Taki pseudogen zachowuje zwykle strukturę genu, od którego pochodzi. Drugi rodzaj pseudogenów powstaje w wyniku integracji do chromosomu segmentu DNA utworzonego przez retrotranskrypcję cząsteczki RNA z udziałem odwrotnej transkryptazy. Takie pseudogeny nie mają intronów ani promotora, natomiast towarzyszy im sekwencja poli A na końcu 3'. Niektóre segmenty DNA generują w ten sposób ogromną liczbę kopii.

W genomach zwierzęcych znajdują się także rozproszone ruchome elementy DNA, z grupy retrotranspozonów. Są to sekwencje przepisywane przy pomocy rewertazy (odwrotnej transkryptazy) z RNA na DNA, a następnie włączane do chromosomów powiększając zawartość DNA w komórce. Wyróżniamy dwa rodzaje tych sekwencji LINES i SINES. Sekwencje typu LINES (*long interspersed repetitive elements*) mają długość 1–5 kpz i powtarzają się 20–40 000 razy [19]. Duży procent genomu stanowią sekwencje typu SINES (*short interspersed repetitive elements*), do których należą np. sekwencje Alu występujące u człowieka. Sekwencja Alu ma długość około 300 pz i występuje w około 500 000 kopii obejmujących ponad 5% genomu [19].

## 2.2. Nadliczbowe chromosomy

Ilość DNA w komórce mogą zwiększać nadliczbowe chromosomy, czyli chromosomy typu B. Charakteryzuje je duża zmienność kształtu, wielkości i liczby. Występują u niektórych osobników w populacji. Po raz pierwszy opisano je u *Hemiptera* w 1907 r. Dziedziczenie tych chromosomów różni się od dziedziczenia chromosomów z zestawu podstawowego. W komórkach poszczególnych tkanek danego osobnika liczba tych chromosomów jest zwykle jednakowa, wyjątek stanowią tu komórki linii płciowej, gdzie liczba chromosomów B może ulegać zmianom. W większości przypadków chromosomy B nie zawierają genów wpływających na fenotyp osobnika. Wpływać jednak mogą na cechy ilościowe, takie jak żywotność czy płodność nosicieli. W literaturze spotkać można różne teorie dotyczące mechanizmów powstawania tych chromosomów. Sugeruje się, że w wyniku błędnych podziałów komórkowych mogły najpierw powstawać trisomiki, mogło dochodzić także do translokacji czy fuzji materiału genetycznego, co

prowadziło do powstania w komórce dodatkowych pojedynczych elementów. Elementy te początkowo wykazywały sekwencje homologiczne do autosomów, z których pochodziły. Następnie część DNA nabierała własności heterochromatyny i traciła homologię z autosomami. Chromosomy B opisano u roślin i u wielu gatunków zwierząt. Występują u wielu owadów, np. u szarańczy (*Locusta migratoria*), u błonkówki (*Nasonia vitripennis*), ale także u ssaków należących do ponad 50 gatunków, przy czym największą grupę stanowią tu gryzonie. Chromosomy B znaleziono np. u jenota (*Nyctereutes procyonoides*), u lisa pospolitego (*Vulpes vulpes*) czy u azjatyckiej myszy drzewnej (*Apodemus peninsulae*) [38].

### 2.3. Mechanizmy zwiększania wielkości genomów: duplikacje genomów

Najbardziej radykalny mechanizm zwiększania się ilości materiału genetycznego stanowi poliploidyzacja, czyli zwielokrotnienie podstawowej liczby chromosomów następujące w wyniku zahamowania cytokinezy w trakcie tworzenia komórek rozrodczych. Jeżeli proces taki odbywa się w obrębie jednego gatunku, powstają autopolioidy o zwielokrotnionych identycznych genomach, natomiast w wyniku skrzyżowania dwu spokrewnionych gatunków mogą się tworzyć allopolioidy zawierające sumy chromosomów obu gatunków wyjściowych. Zwielokrotnienie genomów jest zjawiskiem częstym u roślin, zwłaszcza wyższych, będących organizmami obupłciowymi. Szacuje się, że poliploidy stanowią około połowę lub nawet znacznie więcej roślin kwiatowych [24]. U zwierząt poliploidyzację spotyka się znacznie rzadziej, przypuszczalnie m.in. dlatego że może naruszać mechanizmy chromosomowej determinacji płci i prowadzić do powstania bezpłodnych interseksów. Jednak i wśród zwierząt zgromadzono już wiele przykładów poliploidalności, głównie w tych grupach, w których nie wyodrębniły się zróżnicowane chromosomy płci. Dotyczy to także kręgowców, zwłaszcza ryb i płazów.

### 2.4. Mechanizmy zmniejszania wielkości genomów

Duże różnice w zawartości DNA znalezione pomiędzy poszczególnymi Eukaryota mogą powstawać, jak opisano powyżej, wskutek duplikacji fragmentów chromosomów, poliploidii, utrwalania nadliczbowych chromosomów czy ekspansji satelitarnego DNA i transpozonów. W toku ewolucji obserwuje się jednak nie tylko zwiększanie ilości materiału genetycznego, ale także jego ubytek. Ważną rolę odgrywają tu wspomniane już wcześniej ruchome elementy DNA, czyli transpozony. Między dwoma transpozonomi mającymi tę samą sekwencję nukleotydową może dojść do *crossing over*. Jeżeli uprzednio zostały one wbudowane w chromosom w tej samej orientacji, to rekombinacja między nimi prowadzi do wycinania, czyli do delekcji położonych między nimi odcinków. Jeżeli zaś oba transpozony zostały wbudowane w cząsteczkę DNA w orientacji przeciwnej, to w wyniku zachodzącej między nimi rekombinacji dochodzi do inwersji położonego między nimi odcinka [19].

Charakterystyczna korelacja zachodzi pomiędzy spontanicznymi delekcjami i insercjami a wielkością genomów. Na przykład u *Drosophila*, która ma stosunkowo

mały genom, utrata DNA zachodzi szybciej w toku ewolucji niż u ssaków, które mają znacznie większe genomy. Badano także średnią wielkość delekcji u niektórych gatunków świerszczy (*Laupala*), których genom jest średnio 11 razy większy niż genom *Drosophila*. Stwierdzono, iż delekcje są tu przeciętnie 4 razy mniejsze niż u *Drosophila* [29].

### **3. ZWIĄZEK MIĘDZY WIELKOŚCIĄ GENOMU I WIELKOŚCIĄ KOMÓREK**

Ogromne zróżnicowanie wielkości genomów (ilości DNA) u Eukaryota przekłada się na podobne zróżnicowanie wielkości komórek [5]. Mechanizm tego zjawiska nie jest do końca jasny. Wielkość jąder komórkowych jest silnie skorelowana z ilością DNA, choć na wielkość jądra wpływa dodatkowo stopień upakowania chromatyny, różny nie tylko u różnych grup organizmów, ale zależny także od typu komórki i jej stanu fizjologicznego [5]. Z kolei istnieje silna korelacja pomiędzy objętością jądra i objętością komórki, przy czym wydaje się, że zależność ta jest silniejsza niż bezpośrednia korelacja ilość DNA – wielkość komórki [9]. Historycznie ta właśnie korelacja została najwcześniej zauważona, bo jeszcze w XIX wieku [13]. Jednak już w połowie XX wieku Mirsky i Ris [5,13] zauważyli, że ilość DNA koreluje z masą jądrzastych erytrocytów. Statystyczny związek między ilością DNA i wielkością komórek został następnie potwierdzony u roślin, zwierząt i pierwotniaków. Istnienie statystycznie istotnego związku nie przesądza ani o mechanizmie, ani nawet o łańcuchu przyczynowo-skutkowym. Do dziś występują w tej materii kontrowersje omówione w rozdziale 6.

### **4. SKUTKI ZRÓŻNICOWANIA WIELKOŚCI KOMÓREK: TEMPO METABOLIZMU I TEMPO ROZWOJU**

Wyobraźmy sobie dwa blisko spokrewnione gatunki zwierząt, o identycznych rozmiarach. Niech gatunek A będzie zbudowany ze stosunkowo małej liczby dużych komórek, a gatunek B ze stosunkowo dużej liczby małych komórek. Można iść o zakład, że gatunek B będzie miał wyższe tempo metabolizmu podstawowego. Wynika to z faktu, że duża część energii jest zużywana na utrzymywanie gradientów stężeń między wnętrzem każdej komórki i jej otoczeniem, co jest tym kosztowniejsze, im większy jest stosunek powierzchni do objętości, co ma miejsce przy małych komórkach [37]. Bardzo ważne jest tu założenie, że porównanie odnosi się do gatunków blisko spokrewnionych, gdyż dodatkowym czynnikiem, który mógłby różnicować gatunki bardziej ewolucyjnie odległe, jest przepuszczalność błon komórkowych. Przepuszczalność błon komórkowych jest prawdopodobnie skorelowana z przepuszczalnością błon mitochondrialnych, a utrzymanie gradientu protonów w mitochondriach należy do najbardziej kosztownych

procesów w komórce [30]. Tak więc o tempie metabolizmu w przeliczeniu na jednostkę masy ciała, gdyby go mierzyć na poziomie komórkowym, decydują rozmiary komórek i przepuszczalność błon. Zarówno małe rozmiary komórek, jak i dobrze przepuszczalne błony umożliwiają wydajny transport substratów (substancji odżywczych i tlenu) i metabolitów, ale są związane z wysokimi kosztami utrzymania. Jest to idealna strategia w sytuacji dobrego zaopatrzenia, ale fatalna w czasach niedostatku. Z kolei posiadanie dużych komórek i (lub) słabo przepuszczalnych błon uniemożliwia pełne zagospodarowanie bogatych źródeł energii, ale pozwala lepiej przeżyć czasy niedostatku. Szarski [37] zaproponował, by nazwać pierwszą strategię rozrzućną (*wasteful*), a drugą oszczędną (*frugal*). Rozpatrywał on jednak tylko skutki różnic w wielkości komórek. Wydaje się, że warto w tej klasyfikacji uwzględnić także kryterium przepuszczalności błon.

Łatwo sobie wyobrazić warunki środowiskowe preferujące strategię rozrzućną lub oszczędną. Jeśli w środowisku jest wiele pokarmu, a tlenu też nie brakuje, strategia rozrzućna będzie prowadziła do wyższego dostosowania, zwłaszcza, jeśli doda się omówione dalej wyższe tempo rozwoju organizmów o małych komórkach. Jeśli pokarmu jest permanentnie mało, zdarzają się dłuższe okresy niedostatku, albo zdarzają się często braki tlenu, strategia oszczędna będzie dawać wyższe dostosowanie. W rzeczywistości spodziewamy się kontinuum możliwych strategii. Można jeszcze dodać jedną strategię, polegającą na przełączaniu się ze strategii rozrzućnej na oszczędną w ciągu życia, oczywiście nie poprzez zmianę wielkości komórek, lecz zmianę przepuszczalności błon. Wydaje się jednak, że kręgowce (a nimi przede wszystkim w tym artykule się zajmujemy) mają w tej materii dość ograniczone możliwości, w przeciwieństwie do wielu bezkręgowców, takich jak owady czy pająki, które potrafią wykazywać bardzo wysoki metabolizm, a w sytuacji braku pokarmu radykalnie metabolizm obniżają, dzięki czemu mogą żyć bardzo długo nawet bez pokarmu.

Istnieją bardzo przekonujące dowody związku ilości DNA lub wielkości komórek z tempem metabolizmu. Goniakowska [7] badała *in vitro*, przy zastosowaniu bardzo precyzyjnej metody nurka kartezyjańskiego, tempo oddychania tlenowego erytrocytów u dziewięciu gatunków płazów ogoniastych i bezogonowych. Objętość erytrocytów zmieniała się w zakresie od 1300 do 7800  $\mu\text{m}^3$ , a tempo oddychania w przeliczeniu na jednostkę masy erytrocytu malało z objętością erytrocytu niemal idealnie liniowo na skalach logarytmicznych, przy czym zależność ta wyjaśniała ponad 96% zmienności międzygatunkowej tempa respiracji (obliczenia własne na podstawie danych z pracy Goniakowskiej [7]). Po dodaniu substancji zmniejszającej przepuszczalność błon komórkowych dla jonów sodu i potasu tempo respiracji malało o 47% u żaby mającej małe erytrocyty i o 27% u traszki o dużych erytrocytach [8]. Wprawdzie zakres zmienności wielkości genomu u organizmów stałocieplnych jest znacznie mniejszy niż u zmiennocieplnych (stosunek największej do najmniejszej ilości DNA wynosi około cztery w przypadku ssaków i dwa w przypadku ptaków [9]), ale i tu można stwierdzić związek między tempem metabolizmu i wielkością komórek, mierzoną pośrednio jako ilość DNA. Vinogradov [39] stwierdził, po statystycznym wyeliminowaniu rozmiarów ciała, bardzo silną ujemną zależność tempa metabolizmu podstawowego, w przeliczeniu na gram masy ciała, od ilości DNA. Po wyeliminowaniu wpływu rozmiarów ciała

tempo metabolizmu podstawowego na jednostkę masy ciała maleje wraz z ilością DNA [11,40] i bezpośrednio z wielkością erytrocytów [11] również u ptaków.

Negatywny związek między tempem rozwoju i wielkością komórek lub ilością DNA znaleziono w wielu badaniach, choć nie jest to zjawisko uniwersalne [10]. Negatywne przykłady niekoniecznie świadczą o braku takiego związku, a mogą wynikać z trudności metodycznych zarówno przy definiowaniu, jak i mierzeniu tempa rozwoju, które nie jest w dodatku jednoznaczne z tempem wzrostu, a także z nieuwzględniania w dostatecznym stopniu dodatkowych czynników, takich jak temperatura czy stopień rozwoju w momencie zakończenia pomiarów. Najprawdopodobniej właśnie ten ostatni czynnik jest odpowiedzialny za to, że u organizmów stałocieplnych nie udało się jednoznacznie wykazać związku między wielkością genomu i tempem rozwoju [10]. Natomiast wykonane na płazach badania zdają się potwierdzać ujemną korelację między tempem rozwoju i ilością DNA (w pracy ref. [10] zestawiono nie tylko pozytywne wyniki, ale także wyjątki). Istnieje też silny związek między tempem rozwoju i ilością DNA u owadów [13]. Tempo mitotycznych podziałów komórek zależy silnie od ilości DNA [9], nic więc dziwnego, że embriogeneza przebiega szybciej przy małych genomach, a zatem i z reguły przy małych komórkach. Musimy jedynie pamiętać, że ilość materiałów zapasowych wpływa bezpośrednio na wielkość komórek jajowych, ale wpływ pośredni na tempo rozwoju zależeć będzie od typu embriogenezy; nie należy zatem opierać się we wnioskowaniach na mechanicznych porównaniach, zwłaszcza dla szerokich grup systematycznych różniących się typem embriogenezy. Dalsze etapy rozwoju, polegające w dużej mierze na procesach wzrostowych, są zależne od ilości dostarczanych zasobów, możliwości ich metabolizowania i sposobu lokowania we wzrost, bieżące koszty utrzymania, naprawę DNA, naprawę czy wymianę innych elementów komórek i wreszcie wymianę uszkodzonych komórek. Optymalna alokacja zasobów zależy nie tylko od właściwości fizjologicznych organizmu, ale także od tempa śmiertelności, gdyż przy niskiej śmiertelności wszelkie inwestycje w somę są bardziej opłacalne [20]. Można zatem popełnić ogromne błędy porównując na przykład gniazdowniki, zdolne do przeznaczania ogromnej części dostarczanych zasobów we wzrost i zagniazdowniki, które zużywają większość zasobów na koszty lokomocji i wyższy w związku z aktywnym trybem życia metabolizm podstawowy. Wydaje się, że przedstawiona wcześniej koncepcja kontinuum od oszczędnego do rozrzutnego stylu życia ma tu w pełni zastosowanie i przy dobrze przeprowadzonych badaniach znalezienie związku między ilością DNA (wielkością komórek) i tempem rozwoju będzie bardzo prawdopodobne dla wszystkich grup organizmów. Zależności takie są dobrze udokumentowane u roślin [13]. Co interesujące, wśród roślin jednorocznych, a więc wymagających szybkiego rozwoju, brak jest przedstawicieli o dużych genomach. Podobnie owady o pełnym przeobrażeniu, a więc przechodzące najpierw embriogenezę, a potem budowę wszystkich narządów i tkanek niemal od nowa, mają genomy mniejsze niż przeciętnie wśród owadów [13]. Płazy bezogonowe, których larwy zamieszkują zbiorniki efemeryczne, mają małe genomy [13].

## 5. ILOŚĆ DNA I WIELKOŚĆ KOMÓREK A MASA CIAŁA

Jest podręcznikowym uogólnieniem, iż ilość DNA i masa ciała nie są ze sobą związane. Rzeczywiście, jeśli rozpatrujemy problem na przykład w skali gromady płazów, trudno dopatrzeć się takiego związku: niektóre miniaturowe amerykańskie salamandry mają wielkie genomy, a stosunkowo duże żaby i ropuchy – genomy małe. Inaczej sprawa może wyglądać, jeśli przyjrzymy się węższym grupom systematycznym. Przede wszystkim musimy pamiętać, że zmiana rozmiarów ciała w linii filogenetycznej może następować przez zmianę albo liczby komórek, albo wielkości komórek. Najczęściej zmianom rozmiarów ciała towarzyszą zarówno zmiany liczby, jak i wielkości komórek, różny jest natomiast ich udział. Tylko przy dużym udziale zmian wielkości komórek możemy spodziewać się statystycznego związku między ilością DNA i masą ciała. Niekiedy udaje się ustalić udział wielkości komórek w kształtowaniu rozmiarów ciała. W przypadku gekkonów z rodziny *Eublepharidae* udział ten jest rzędu 15–20% [34]. Można się spodziewać, że korelacja rozmiarów ciała z ilością DNA byłaby też istotna. Istnieje też bardzo silna korelacja między ilością DNA i objętością ciała u wirków i widłonogów [15].

Dobór sztuczny prowadzony w kierunku zwiększenia lub zmniejszenia rozmiarów odwłoka w populacjach laboratoryjnych *Drosophila subobscura* pokazuje również rolę zmian zarówno liczby, jak i rozmiarów komórek [27]. Masa ciała zmieniła się po około 100 pokoleniach o 10–27%, w zależności od płci i kierunku selekcji, a powierzchnia skrzydła aż o 34–50%. W przypadku powierzchni skrzydeł możliwe było oszacowanie udziału zmiany wielkości i liczby komórek. Co interesujące, w linii selekcyjowanej na większe rozmiary prawie cały wzrost nastąpił poprzez zwiększenie liczby komórek, natomiast w linii selekcyjowanej na małe rozmiary poprzez zmniejszenie wielkości komórek. Byłoby niezmiernie istotne stwierdzenie, czy skarleniu komórek towarzyszyło zmniejszenie ilości niekodującego DNA, czy też występowały jedynie zmiany w genach kierujących cyklem komórkowym. To drugie rozwiązanie jest możliwe, na co wskazuje przykład radykalnego zmniejszenia rozmiarów ciała *Drosophila* poprzez zmniejszenie wielkości komórek, spowodowane jedną mutacją *dS6K* biorącego udział w regulacji cyklu komórkowego [24]. To, że dobór na małe rozmiary działa przede wszystkim poprzez zmniejszenie wielkości komórek, nie powinno być zaskoczeniem. Znane są wprawdzie przypadki miniaturyzacji poprzez zmniejszenie liczby komórek, na przykład u salamander, szczególnie z rodziny *Bolitoglossini*, ale miniaturyzacja taka prowadzi do uproszczenia morfologicznego nawet tak ważnych struktur jak mózg [31]. Oczywiście kompensacją jest uzyskanie skrajnie oszczędnego stylu życia, wymagającego niewielkiej ilości pokarmu i to dostarczanego w nierównomiernym tempie.

Współczynniki nachylenia regresji logarytmów ilości DNA od logarytmów masy ciała wykazują statystycznie istotną heterogenność na poziomie rzędów zarówno u ptaków, jak i ssaków [21]. Wskazuje to na różny w poszczególnych rzędach tych dwóch gromad udział zmian liczby komórek i wielkości komórek w kształtowaniu masy ciała. W kilku rzędach ptaków i ssaków zależność jest ujemna, czyli ilość DNA maleje z masą ciała, jednak tylko w przypadku nietoperzy taka negatywna zależność jest istotna



statystycznie. Podobną heterogenność na poziomie rzędów wykazują współczynniki nachylenia zależności logarytmów tempa metabolizmu podstawowego od logarytmów masy ciała [21]. W dodatku zarówno u ptaków, jak i ssaków współczynniki kątowe regresji ilości DNA i regresji tempa metabolizmu od masy ciała wykazują istotną statystycznie ujemną korelację [21]. Wskazuje to po pierwsze na rolę ilości DNA, zapewne poprzez jego wpływ na wielkość komórek, w kształtowaniu tempa metabolizmu. Po drugie, heterogenność nachyleń obu regresji przy równoczesnej ujemnej korelacji współczynników nachyleń jest argumentem za zróżnicowanym pomiędzy rzędami udziałem zmian wielkości komórek i ich liczby w kształtowaniu masy ciała. Ponieważ, przynajmniej teoretycznie, różnice masy ciała mogą być uzależnione od różnic w rozmiarach komórek w przedziale od 0 do 100%, powinno się to przekładać na zakres możliwych nachyleń regresji tempa metabolizmu od masy ciała w przedziale od 0,67, gdyby masa ciała różnicowała się międzygatunkowo wyłącznie poprzez powiększanie komórek, do 1,0, gdyby masa ciała różnicowała się wyłącznie poprzez zmiany liczby komórek. Ponieważ oba te procesy występują łącznie, współczynniki nachylenia regresji metabolizmu podstawowego przyjmują wartości pośrednie, najczęściej w przedziale 0,6–0,8 [21]. Tak więc badania ilości niekodującego DNA mogą przyczynić się do rozwiązania starego i wciąż nierozwiązanego zadowalająco problemu skalowania tempa metabolizmu zgodnie z równaniem: tempo metabolizmu =  $a$  masa <sup>$b$</sup> , gdzie współczynnikowi  $b$  przypisuje się najczęściej wartość bądź 0,67, bądź 0,75, pomimo dobrze udokumentowanej jego heterogenności [21].

## 6. MECHANIZM ZWIĄZKU MIĘDZY WIELKOŚCIĄ GENOMU I ROZMIARAMI KOMÓREK

Skoro wielkość komórek zależy, choćby tylko pośrednio, od ilości DNA w jądrze, a jak pokazano w poprzednim rozdziale, ich wielkość ma ogromny wpływ na tak ważne dla cyklu życiowego cechy jak tempo metabolizmu i tempo rozwoju, wielkość genomu musi znajdować się pod silną presją selekcyjną. Należy zdecydowanie odrzucić pojęcia, takie jak „DNA śmieciowy” czy „złomowy” („*junk DNA*”). Niestety przesadna fascynacja zapisem informacji genetycznej w ostatnich dekadach, przy równoczesnym osłabieniu całościowego spojrzenia na funkcjonowanie organizmów żywych, przyczyniła się do utrwalenia przekonania, że zróżnicowanie wielkości genomów jest czysto mechanicznym skutkiem właściwości DNA, prowadzących do powstawania opisanych w rozdz. 2 sekwencji powtarzalnych. To prawda, że zwiększanie się genomów wynika z natury DNA, ale istnieją przecież także mechanizmy usuwania niepotrzebnego DNA (rozd. 2). Co więcej, w wielu liniach ewolucyjnych genomy zostały konsekwentnie wyczyszczone ze znacznej części niekodującego DNA; jako przykład mogą służyć płazy bezogonowe [35] lub ryby kostnoszkieletowe [17].

Zwolennicy poglądu, że ilość DNA wynika jedynie z samolubnego charakteru DNA i nie wywiera wpływu na właściwości organizmów, musieli jakoś wyjaśnić statystyczny związek między wielkością genomu i wielkością komórek. Ich wyjaśnienie zakłada, że

u gatunków o małych komórkach dobór naturalny działał silniej na wyczyszczanie genomu z niepotrzebnych elementów niż u gatunków o dużych komórkach. Wynika to stąd, że przy szybkich podziałach charakteryzujących małe komórki duży nadmiar DNA byłby zbyt wielkim balastem i konieczność powielania tego niepotrzebnego DNA opóźniałaby procesy podziałowe, a zatem także tempo rozwoju. Zatem małe rozmiary komórek byłyby przyczyną, a mała ilość zawartego w nich DNA jedynie skutkiem [26]. Poglądy te łatwo jest sfalsyfikować, jeśli wielkość komórek zmieniałaby się natychmiast wraz ze zmianami ilości DNA. A tak jest w istocie. Sztucznie wyprodukowane triploidy łośosia mają większe komórki [2,33], podobnie jak naturalne triploidy ryby kozy *Cobitis taenia* [4] lub triploidy wynikłe z krzyżowania diploidalnych żab *Hyla chrysoscelis* z tetraploidalnymi *Hyla versicolor* [18]. U rzadko pojawiających się chimer  $1n/3n$  żaby *Rana esculenta* występują równocześnie duże i małe erytrocyty [3]. U drożdży, mogących występować albo w formie diploidalnej, albo haploidalnej, haploidy mają zaledwie 58% objętości diploidów [32]. Obecność większej liczby chromosomów  $B$  także skutkuje większymi rozmiarami komórek [9]. Jest to bardzo ważne, gdyż trudno sobie wyobrazić, by geny odpowiedzialne bezpośrednio za rozmiary komórek miały swe kopie akurat w tych chromosomach. Wreszcie endopoliploidyzacja [14] lub dyminucja chromatyny [41] przekładają się natychmiast na wielkość komórek w obrębie tego samego organizmu.

Od wielu lat Cavalier-Smith [5] forsuje inny scenariusz zależności między ilością DNA, wielkością jąder komórkowych i wielkością komórek. Rozmiary komórek są zależne od genów regulujących przebieg cyklu komórkowego, zatem są całkowicie niezależne od samej ilości DNA, która wpływa jednak bezpośrednio na rozmiary jądra. Ponieważ istnieje optymalny stosunek wielkości jądra do wielkości cytoplazmy, w przypadku zmiany genetycznej zwiększającej lub zmniejszającej rozmiary komórki pojawia się nacisk doboru na odpowiednie zwiększanie lub zmniejszanie ilości DNA, tak aby przywrócić optymalny stosunek jądro-cytoplazmatyczny. Oczywiście przywrócenie tego stosunku możliwe byłoby także poprzez zmiany w genach prowadzące odpowiednio do luźniejszego lub ciaśniejszego upakowania chromatyny, ale zmiany takie są dużo mniej prawdopodobne niż niespecyficzne zmiany w niekodujących sekwencjach prowadzące do zwiększania lub zmniejszenia ilości DNA. Tak więc według scenariusza Cavalier-Smitha zmiany rozmiarów komórek są pierwotne, a zmiany ilości DNA reprezentują jedynie wtórne procesy odtwarzające optymalny stosunek jądro-cytoplazmatyczny. Ponieważ dobór w kierunku zwiększania się lub zmniejszania rozmiarów komórek nie musi mieć charakteru skokowego, lecz może reprezentować dłuższą tendencję w toku ewolucji danego gatunku, nadążająca za tymi zmianami alteracja ilości DNA będzie miała także mniej czy bardziej ciągły charakter. Cavalier-Smith pisze więc o koewolucji wielkości komórek i wielkości jąder (poprzez ewolucję ilości DNA). Choć wiele argumentów przytaczanych przez tego autora wydaje się przekonujące, zwłaszcza wiedza o genetycznych uwarunkowaniach cyklu komórkowego, pozostaje do wyjaśnienia zjawisko natychmiastowego reagowania rozmiarów komórek na zmiany ilości DNA. Koncepcja Cavalier-Smitha w swej oryginalnej postaci wydaje się tu bezsilna. Nie można jednak wykluczyć, że optymalność stosunku jądro-

cytoplazmatycznego ma tak kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki, że program genetyczny cyklu komórkowego obejmuje również natychmiastowe dopasowanie wielkości komórki do każdej zmiany ilości DNA. Gdyby posiadanie nieoptymalnych rozmiarów komórek było zdecydowanie „mniejszym złem” niż posiadanie nieoptymalnego stosunku jądro-cytoplazmatycznego, to wbudowanie takiego mechanizmu jest prawdopodobne. Stan nieoptymalności wielkości komórek byłby tylko przejściowy, gdyż powolny proces równoczesnego zmniejszania małymi krokami komórek i zmniejszania ilości DNA lub równoczesnego zwiększania komórek i ilości DNA dopasowywałby wielkość komórek do optymalnych rozmiarów bez fazy zachwianej równowagi jądro-cytoplazmatycznej.

Najstarszą próbą wyjaśnienia związku pomiędzy ilością DNA, wielkością jąder i rozmiarami komórek jest koncepcja nukleotypu, wprowadzona przez Commonera w 1964 r. i rozwijana dalej przez Bennetta [ref. 9, 25]. Według tej koncepcji ilość DNA miałaby bezpośrednio lub pośrednio poprzez wielkość jądra wpływać na rozmiary komórki. Mechanizm polegałby na niewyjaśnionym zadawalająco wpływie na długość cyklu komórkowego, oczywiście we współdziałaniu z genami bezpośrednio ten cykl regulującymi. Ponieważ wielkość komórek ma bardzo istotny wpływ na fenotyp (rozd. 3 i 4), dobór działałby bezpośrednio na ilość DNA, a pośrednio na wielkość komórki. Wydaje się, że z tą koncepcją najbardziej sympatyzuje Gregory [9], choć stara się obiektywnie przedstawić pozostałe koncepcje. Jednak mechanizm oddziaływania ilości DNA na długość cyklu komórkowego przedstawiony przez tego autora jest wysoce hipotetyczny i nie przeszedł, przynajmniej na razie, weryfikacji empirycznej. Koncepcja nukleotypu, i z dotychczasowo proponowanych tylko ona, pozwala łatwo wyjaśnić natychmiastową reakcję rozmiarów komórek na zmiany ilości DNA. Jednak proponowana przez nas modyfikacja modelu Cavalier-Smitha radzi sobie także z tym zagadnieniem. Jedynie model zakładający czysto śmieciowy charakter niekodującego DNA, a więc nieoddziałujący na fenotyp poza niewielkim kosztem związanym z koniecznością duplikacji dużej ilości DNA, wydaje się zupełnie nieprzydatny do wyjaśniania takich natychmiastowych zmian.

## 7. WNIOSKI

Powyżej przedstawiliśmy dwa zasadniczo różne podejścia do wyjaśniania ogromnej zmienności w ilości niekodującego DNA wśród zwierząt. W pierwszym podejściu zasadniczą rolę w kształtowaniu tej zmienności przypisuje się właściwościom DNA. W drugim podejściu zakłada się istotny wpływ samej ilości DNA na fenotypy organizmów, przede wszystkim tempo metabolizmu i tempo rozwoju. W rzeczywistości przeciwstawianie tych mechanizmów nie jest metodologicznie poprawne. Opisane w rozdz. 2 mechanizmy zwiększania lub zmniejszania ilości niekodującego DNA stanowią nacisk mutacyjny [28]. Należy się spodziewać zróżnicowania między taksonami częstości delekcji i insercji, a one przecież u zwierząt, w przeciwieństwie do roślin [25], stanowią

najistotniejszy mechanizm zmian ilości DNA. Także przeciętna wielkość delecji i insercji różni się między taksonami. Zatem różny będzie też wynik netto, a więc presja mutacyjna na zmiany wielkości genomu, podobnie jak różna bywa presja mutacyjna w przypadku mutacji punktowych. Jednak zarówno dla sekwencji kodujących, jak i zmian ilości DNA presja mutacyjna nigdy nie działa samodzielnie, lecz zawsze w połączeniu z doбором lub dryfem genetycznym. Tak jak częstości alleli są wynikiem równowagi mutacyjno-selekcyjnej, w małych populacjach dodatkowo modyfikowanym dryfem, tak i ilość niekodującego DNA musi być wynikiem równowagi tych procesów [28]. Mutacje szkodliwe są tym częstsze, im silniejsza jest presja mutacyjna i słabszy dobór. Podobnie ilość niekodującego DNA będzie tym większa, im silniejsza jest presja netto w kierunku zwiększania genomów i im słabszy jest dobór przeciwko nadmiarowi DNA. Dopóki uważano, że szkodliwy wpływ nadmiaru DNA polega jedynie na kosztach powielania DNA i związanego z tym spowolnienia podziałów komórkowych, rola presji mutacyjnej wydawała się dominująca. Jednak związek ilości DNA z wielkością komórek, a poprzez ten parametr z wieloma bardzo istotnymi cechami fenotypu (rozdz. 4) powoduje, iż równowaga mutacyjno-selekcyjna może być przesunięta, i to w kierunku zarówno mniejszej, jak i większej ilości DNA niż wynikałoby to jedynie z równowagi między pojawianiem się delecji i insercji. Mechanizm może być tu dwojaki: same mechanizmy genetyczne wpływające na częstość i wielkość delecji i insercji mogą być kontrolowane przez dobór, a dodatkowo osobniki o mniejszej (lub większej) ilości DNA mogą pozostawiać więcej lub mniej potomstwa. W miarę poznawania genomów kolejnych gatunków coraz lepiej potrafimy szacować częstość i wielkość delecji i insercji [28], ale często zapominamy, że szacunki te nie określają wyłącznie presji mutacyjnej, ale wynik równowagi mutacyjno-selekcyjnej. 11 razy większe niż u muszki owocowej *Drosophila* genomy u hawajskich świerszczy z rodzaju *Laupala* współwystępują z mniejszą u tego gatunku częstością delecji, większą insercji, mniejszymi średnio delecjami i większymi insercjami [29], ale nie jest to dowód na większy nacisk mutacji na zwiększanie ilości DNA, bo nic nie wiemy o sile doboru na wielkość komórek w obu tych taksonach.

Jak widać, kluczową rolę w wyjaśnieniu różnorodności wielkości genomów odgrywać będzie zrozumienie relacji: ilość DNA – wielkość jąder – wielkość komórek – cechy fenotypowe organizmów. Weryfikacja i modyfikacja poszczególnych modeli wymaga na pewno dalszych badań na gruncie genetyki (mechanizmy zmian ilości DNA), biologii komórki (związek między ilością DNA i rozmiarami komórek) i ekologii (związek między rozmiarami komórek i cechami ekofizjologicznymi wpływającymi na kierunek doboru). Konieczne jest w nich bardziej całościowe podejście do biologii, nie tylko poprzez pryzmat informacji zapisanej w sekwencji nukleotydów.

## PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania składamy Marcinowi Czarnołęskiemu, Markowi Konarzewskiemu, Marii Ogielskiej, Marii Olszewskiej i Barbarze Śliz za cenne uwagi w trakcie przygotowywania do druku tego artykułu.

## LITERATURA

- [1] BAILEY JA, GU ZP, CLARK RA, REINERT K, SAMONTE RV, SCHWARTZ S, ADAMS MD, MYERS EW, LI PW, EICHLER EE. Recent Segmental Duplications in the Human Genome. *Science* 2002; **297**: 1003–1007.
- [2] BENFEY TJ, SUTTERLIN AM. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Biol* 1984; **24**: 333–338.
- [3] BERGER L, OGIELSKA M. Spontaneous haploid-triploid mosaicism in the progeny of a *Rana* kl. *Esculenta* female and *Rana lessonae* males. *Amphibia-Reptilia* 1994, **15**: 143–152.
- [4] BOROŃ A. Use of erythrocyte measurements to detect natural triploids of spined loach *Cobitis taenia* (L.). *Cytobios* 1994; **78**: 197–202.
- [5] CAVALIER-SMITH T. Economy, Speed and Size Matter: Evolutionary Forces Driving Nuclear Genome Miniaturization and Expansion. *Ann Bot* 2005; **95**: 147–175.
- [6] FRAZER KA, TAO H, OSOEGAWA K, DE JONG PJ, CHEN XY, DOHERTY MF, COX DR. Noncoding Sequences Conserved in a Limited Number of Mammals in the Sim2 Interval Are Frequently Functional. *Genome Res* 2004; **14**: 367–372.
- [7] GONIAKOWSKA L. The respiration of erythrocytes of some amphibians *in vitro*. *Bull Acad Pol Sci, Ser sci biol* 1970; **18**: 793–797.
- [8] GONIAKOWSKA-WITALINSKA L. Effect of ouabain on oxygen consumption and on osmotic swelling of amphibian erythrocytes. *Bull Acad Pol Sci, Serie sci biol* 1976; **24**: 221–226.
- [9] GREGORY TR. Coincidence, Coevolution, or Causation? DNA Content, Cell Size, and the C-Value Enigma. *Biol Rev* 2001; **76**: 65–101.
- [10] GREGORY TR. Genome size and developmental complexity. *Genetica* 2002; **115**: 131–146.
- [11] GREGORY TR. A bird's-eye view of the C-value enigma: Genome size, cell size, and metabolic rate in the class aves. *Evolution* 2002; **56**: 121–130.
- [12] GREGORY TR. Animal Genome Size Database. [www.genomesize.com](http://www.genomesize.com). 2005.
- [13] GREGORY TR. The C-Value Enigma in Plants and Animals: a Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Ann Bot* 2005; **95**: 133–146.
- [14] GREGORY TR, HEBERT PDN. The Modulation of DNA Content: Proximate Causes and Ultimate Consequences. *Genome Res* 1999; **9**: 317–324.
- [15] GREGORY TR, HEBERT PDN, KOLASA J. Evolutionary Implications of the Relationship between Genome Size and Body Size in Flatworms and Copepods. *Heredity* 2000; **84**: 201–208.
- [16] GREILHUBER J, DOLEZEL J, LYSAK MA, BENNETT MD. The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms „Genome Size’ and «c-Value» to Describe Nuclear DNA Contents. *Ann Bot* 2005; **95**: 255–260.
- [17] HARDIE DC, HEBERT PDN. Genome-Size Evolution in Fishes. *Can J Fish Aquat Sci* 2004; **61**: 1636–1646.
- [18] KELLER MJ, GERHARDT HC. Polyploidy Alters Advertisement Call Structure in Gray Treefrogs. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2001; **268**: 341–345.
- [19] KLUG WS, CUMMINGS MR. Genetics: A molecular perspective. Published by Pearson Education, Inc Upper Saddle River, New Jersey 07458, 2003
- [20] KOZŁOWSKI J. Why life histories are diverse. *Pol J Ecol* 2006; w druku.
- [21] KOZŁOWSKI J, KONARZEWSKI M, GAWELCZYK AT. Cell size as a link between noncoding DNA and metabolic rate scaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 14080–14085.
- [22] LYNCH M. Genomics – Gene Duplication and Evolution. *Science* 2002; **297**: 945–947.
- [23] MARCAIS B, BELLIS M, GERARD A, PAGES M, BOUBLIK Y, ROIZES G. Structural organization and polymorphism of the alpha satellite DNA sequences of chromosome 13 and 21 as revealed by pulse field gel electrophoresis. *Human Genetics* 1991; **86**: 311–316.
- [24] MONTAGNE J, STEWART MJ, STOCKER H, HAFEN E, KOZMA SC, THOMAS G. *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 1999; **285**: 2126–2129.
- [25] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T. Ewolucja rozmiarów genomów jądrowych u roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 737-751.
- [26] PAGEL M, JOHNSTONE RA. Variation across species in the size of the nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the C-value paradox. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1992; **249**: 119–124.

- [27] PARTRIDGE L, LANGELAN R, FOWLER K, ZWAAN B, FRENCH V. Correlated Responses to Selection on Body Size in *Drosophila Melanogaster*. *Genet Res* 1999; **74**: 43–54.
- [28] PETROV DA. Evolution of Genome Size: New Approaches to an Old Problem. *Trends Genet* 2001; **17**: 23–28.
- [29] PETROV DA, SANGSTER TA, JOHNSTON JS, HARTL DL, SHAW KL. Evidence for DNA Loss as a Determinant of Genome Size. *Science* 2000; **287**: 1060–1062.
- [30] PORTER, RK. Allometry of Mammalian Cellular Oxygen Consumption. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 815–822.
- [31] ROTH G, BLANKE J, WAKE DB. Cell size predicts morphological complexity in the brains of frogs and salamanders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4796–4800.
- [32] SHERMAN F. Getting started with yeast. W: *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Ch. Guthrie & G.R. Fink (eds.) Academic Press, San Diego 1991; 3–21.
- [33] SMALL SA, BENFEY TJ. Cell size in triploid salmon. *J Exp Zool* 1987; **241**: 339–342.
- [34] STAROSTOVA Z, KRATOCHVIL L, FRYNTA D. Dwarf and Giant Geckos from the Cellular Perspective: the Bigger the Animal, the Bigger Its Erythrocytes? *Funct Ecol* 2005; **19**: 744–749.
- [35] SZARSKI H. Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution. *Nature* 1970; **226**: 651–652.
- [36] SZARSKI H. Zagadnienie rozmiarów komórek zwierząt kręgowych. *Post Biol Kom* 1974; **1**: 311–344.
- [37] SZARSKI H. Cell size and the concept of wasteful and frugal evolutionary strategies. *J Theor Biol* 1983; **105**: 201–209.
- [38] ŚWITOŃSKI M, SŁOTA E, JASZCZAK K. Diagnostyka cytogenetyczna zwierząt domowych. Wydawn. AR, Poznań 2006.
- [39] VINOGRADOV AE. Nucleotypic effect in homeotherms: body-mass-corrected basal metabolic rate of mammals is related to genome size. *Evolution* 1995; **49**: 1249–1259.
- [40] VINOGRADOV AE. Nucleotypic Effect in Homeotherms: Body-Mass Independent Resting Metabolic Rate of Passerine Birds Is Related to Genome Size. *Evolution* 1997; **51**: 220–225.
- [41] WYNGAARD GA, GREGORY TR. Temporal Control of DNA Replication and the Adaptive Value of Chromatin Diminution in Copepods. *J Exp Zool* 2001; **291**: 310–316.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 25.09. 2006 r.*

*Przyjęto: 16.10. 2006 r.*

*Gronostajowa 7, 30-387 Kraków,*

*kozlo@eko.uj.edu.pl*

## EWOLUCJA ROZMIARÓW GENOMÓW JĄDROWYCH U ROŚLIN OKRYTOZALĄŻKOWYCH\*

EVOLUTION OF NUCLEAR GENOME SIZE IN ANGIOSPERM PLANTS

Maria Joanna OLSZEWSKA, Tomasz SAKÓWICZ

Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

*Streszczenie:* W ciągu minionych kilku lat znacznie wzbogaciła się wiedza o ewolucji zawartości jądrowego DNA. U okrytozalachkowych rozmiary genomu różnią się ponad 1000-krotnie. W odległej przeszłości następowała poliploidyżacja genomów. Znaczne różnice rozmiarów genomów są spowodowane głównie przez odmienną liczbę rund duplikacji u przodków oraz przez inwazję retroelementów. Liczba retroelementów jest dodatnio skorelowana z rozmiarami genomu. W wyniku podwajania liczby genów następowała ich dywergencja (subfunkcjonalizacja), zatem duplikacja genomów stała się potężną siłą napędową w ewolucji. Rozmiary genomu są dodatnio skorelowane z czasem trwania cyklu życiowego, cyklów mitotycznych i meiotycznych oraz z objętością jądra. Redukcja rozmiarów genomów zachodzi u naturalnych auto- i allopoliploidów. W przeciwieństwie do gatunków z małym genomem, gatunki z dużymi genomami, bogatymi w retroelementy charakteryzują się niskim potencjałem adaptacyjnym i obniżoną dywergencją, są eliminowane ze środowisk o krańcowych warunkach i zagrożone wyginięciem. Te stwierdzenia wydają się wskazywać na ewolucyjną tendencję w kierunku redukcji rozmiarów genomów.

*Słowa kluczowe:* ewolucja rozmiarów genomów, podwojenie genów i genomów, retroelementy, adaptacja.

*Summary:* Our understanding of the evolution of DNA content in angiosperm plants has improved in recent years. Genomes in angiosperms vary in DNA content over 1000-fold. Variations in plant genome size are primarily due to differences in ancestral polyploidy and the periodic burst in activity of retroelements. Genomic data show a strong correlation between the size of genome and the amount of retroelements. Gene duplication have contributed to the functional divergence of the duplicates, and have become a strong evolutionary force. Genome size also correlates with the span of life cycle, duration of mitotic and meiotic cycles, and nuclear volumes. Reduction of genome size occurs in natural auto- and allopolyploids. Species with large genomes saturated with retroelements do not adapt well and are underrepresented in extreme environments. These species tend to diverge slowly and hence are threatened with extinction over time. The above findings provide basis for evolutionary trends to reduce nuclear genome size in plants.

*Key words:* genome size evolution, gene and genome duplication, retroelements, adaptation.

\*Praca finansowana z badań statutowych Uniwersytetu Łódzkiego nr 505/04996.

## 1. WSTĘP

Badania rozmiarów genomów jądrowych u Eukaryota stały się możliwe po wprowadzeniu metod cytometrycznych pomiaru zawartości DNA bądź *in situ*, bądź na izolowanych jądrach. Jako pierwsze zostały wprowadzone mikrodensytometryczne metody *in situ* po zabarwieniu DNA metodą Feulgena, a następnie – cytometrii przepływowej z zastosowaniem jąder izolowanych. Poprawnemu przeprowadzeniu badań przy użyciu obu tych metod poświęcono wiele uwagi. Wiadomo, że wyniki uzyskane obiema metodami są porównywalne [23], (ref. [35]). Ustalenie szczegółowe postępowania w metodzie cytometrii przepływowej jest ciągle jeszcze tematem licznych opracowań [5, 11, 34, 35]. Wyniki dotyczące rozmiaru genomu u roślin, tj. zawartości w nich DNA, wyrażone w pg lub liczbą par zasad (pz) są gromadzone w banku danych – *The Plant DNA C-values Database* ([www.rbg.kew.org.uk/cval/homepage.html](http://www.rbg.kew.org.uk/cval/homepage.html)); ostatnie dane są podane przez Bennetta i Leitcha [5]. Definicja pojęcia 1C i 2C jest szeroko dyskutowana, szczególnie w odniesieniu do królestwa roślin, wśród których, głównie wśród okrytozalążkowych, dominują gatunki allopoliploidalne [17]. W niniejszym artykule przyjęto, że 1C to zawartość DNA w niezreplikowanych komórkach haploidalnych, 2C – w fazie G<sub>0</sub> lub G<sub>1</sub> cyklu komórkowego.

Już wkrótce po uzyskaniu szeregu danych dotyczących zawartości DNA w komórkach haploidalnych lub diploidalnych okazało się, że w królestwie roślin, zwierząt i grzybów brak jest spójności między poziomem rozwoju ewolucyjnego a rozmiarami genomu. Zjawisko to nazwano paradoksem C DNA (ref. [37]). Polega ono na fakcie, że kodowanie białek lub rRNA i tRNA nie jest jedyną funkcją DNA w genomie [8]. Co prawda, porównanie 1C DNA u roślin lądowych: mszaków (0,53 pg), widłaków (3,81), paprotników i innych grup zaliczanych do *Monilophyta* (13,58 pg), nagozalążkowych (16,99 pg) i okrytozalążkowych (6,30 pg) wskazuje, że w królestwie roślin prawidłowość taka istnieje w wymienionych grupach do nagozalążkowych włącznie, ale brak jej w obrębie roślin okrytozalążkowych stojących najwyżej w ewolucji. U roślin okrytozalążkowych różnice w rozmiarach genomów są przeszło 1000-krotne (od 0,11 pg do 127,40 pg), zaś u mszaków – zaledwie 12-krotne (ref. [27]). U glonów natomiast rozpiętość rozmiarów genomów jest 1300-krotna [15]. Uwzględnienie rozmiarów genomów przy konstruowaniu dendrogramów opartych na danych taksonomicznych i aktualnych poglądach na pokrewieństwa w obrębie danej grupy wykazało, że wskutek znacznej zmienności rozmiarów genomów nawet w obrębie rodzaju i gatunku (por. rozdz. 5.) ta cecha jest mało przydatna w analizach filogenetycznych [27].

Podstawowym odkryciem, które stało się punktem wyjścia do dalszych badań wyjaśniających paradoks C DNA i ewolucji rozmiarów genomu, stało się wykazanie przez Flavella i wsp. [12, 13] wysokiej dodatniej korelacji między rozmiarami genomu (w pg DNA) a zawartością sekwencji powtarzalnych (również w pg DNA) oraz stwierdzenie, że w toku ewolucji, począwszy od 200 milionów lat temu, genomy roślin w znacznej mierze, a w mniejszym stopniu genomy zwierząt ulegały kolejnym cyklom poliploidyacji (ref. [1]).



Od 1998 r. istnieje międzynarodowa grupa skupiona wokół badań genomu roślin okrytozalążkowych, organizująca co kilka lat warsztaty pod nazwą „*Angiosperm Genome Size Workshop*” [4]. Dzięki działalności tej grupy, badania ewolucji rozmiarów genomów u roślin są intensywnie prowadzone, a uzyskiwane wyniki są dyskutowane i publikowane w kolejnych numerach *Annals of Botany* (ostatnio w nr 1, tom 95 w 2005 r.). Organizatorzy tej grupy wyrazili nadzieję, że „... *increased knowledge and understanding of genome size will contribute to holistic genomic studies in both plants and animals in the next decade*” [4]. Redakcja *Postępów Biologii Komórki* zamieszcza zatem obok siebie artykuły dotyczące królestwa roślin i królestwa zwierząt.

Rola poliploidyzacji i udział sekwencji powtarzalnych ze szczególnym uwzględnieniem ruchomych elementów w ewolucji rozmiarów genomu u roślin okrytozalążkowych zostaną omówione poniżej. Ze względu na w miarę dobrze poznaną strukturę genomu u roślin uprawnych i u modelowego gatunku *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik) z jednym z najmniejszych genomów (1C DNA = 0,2 pg = 157 Mpz), głównie tych roślin dotyczą przedstawiane wyniki.

## 2. POLIPLÓIDYZACJA I EWOLUCJA GENOMU

Poliploidyzacja genomów jądrowych w toku ewolucji przebiegała z większą częstotliwością u roślin niż u zwierząt, wśród których dobrze udokumentowane przykłady odnoszą się do kęgowców i owadów (ref. [2]). Wśród roślin okrytozalążkowych poliploidyzacji uległo 70–80% gatunków. Nie wszystkie ulegały takiej samej liczbie rund poliploidyzacji; ich liczba w ciągu 200 milionów lat przypuszczalnie wyniosła od 2 do 5 (ref. [28]), a najstarsze – paleopoliploidy – powstały wiele setek milionów lat temu. Duplikacja genomu miała miejsce nawet u gatunków żyjących współcześnie z tak małym genomem jak *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik) i *Oryza sativa* (ryż). Duplikacja genomu powoduje istotne skutki zarówno na poziomie molekularnym, jak i genotypowym. Skutkiem poliploidyzacji była przebudowa genomu, duplikacje segmentalne i częściowa utrata lub modyfikacja sekwencji kodujących, zaś u allopoliploidów – translokacje międzygenomowe (por. rozdz. 5.). W świetle danych z zakresu molekularnej analizy genomów można przyjąć, że jedna runda podwojenia genomów miała miejsce po dywergencji dwuliściennych, a druga – po dywergencji rodzajów *Arabidopsis* i *Brassica* z ich wspólnego przodka – zapewne *Gossypium* (bawełna) (ref. [1]).

Brak wszystkich podwojonych genów we współczesnych genomach, których przodkowie ulegli poliploidyzacji, jest objaśniany przez utratę niektórych powtórzonych sekwencji (por. rozdz. 3. i 4.). Zróznicowana eliminacja powtórzonych sekwencji – zarówno kodujących, jak i niekodujących – po poliploidyzacji jest przyczyną istnienia wśród spokrewnionych gatunków licznych odchyień w kolinearności genów (ang. *co-linearity of genes*), tj. w liniowym ułożeniu genów w tym samym chromosomie. Taka sytuacja występuje u zbóż. Skumulowany efekt obu procesów, tj. podwojenia genomu i utraty genów doprowadził do powstania współczesnych genomów u roślin okrytozalążkowych, u których istnieje syntenia z tylko częściowym sprzężeniem genów (ref. [1]).

### 3. GENY W GENOMACH PODWOJONYCH W TOKU EWOLUCJI

W wyniku poliploidyzacji w odległej przeszłości następowało podwojenie liczby genów. Podczas ewolucji sekwencje kodujące mogą być utracone, zmutowane lub ulec wyciszeniu.

Fakt, że zduplikowane geny są zachowywane w sposób nieprzypadkowy, sugeruje, że poliploidyzacja dostarcza materiału genetycznego umożliwiającego adaptację poprzez dywergencję (por. rozdz. 6.). U *Arabidopsis* co najmniej połowa genów powstałych w wyniku niedawnej poliploidyzacji (tj. ok. 5 milionów lat temu) ma odmienny wzór ekspresji. Geny takie uległy funkcjonalnemu zróżnicowaniu, a w konsekwencji nastąpiła dywersyfikacja szlaków metabolicznych i dywersyfikacja ewolucyjna [1].

Częstym wynikiem modyfikacji podwojonych genów jest ich tzw. subfunkcjonalizacja; jest to proces zwany DDC (ang. *Duplicate, Degenerate, Complement*), podczas którego w wyniku mutacji następuje częściowa utrata funkcji (ref. [22, 41]). Geny regulatorowe, jak np. czynniki transkrypcyjne, są uznawane za dobry przykład funkcjonalnej i regulatorowej dywersyfikacji w rodzinach zduplikowanych genów. U *Arabidopsis thaliana* powielone geny uczestniczą w reakcjach obronnych przeciwko pasożytom roślinożernym, transdukcji sygnałów i regulacji ekspresji (ref. [32]).

Dobrym przykładem losów podwojonych genów, które uległy subfunkcjonalizacji, jest rodzina genów z kasyty MADS, które są zaangażowane w kontrolę procesów kwitnienia. W toku ewolucji te geny wielokrotnie wskutek kolejnych rund poliploidyzacji uległy daleko posuniętej specjalizacji (subfunkcjonalizacja), kontrolując inicjację merystemu kwiatowego, poszczególne etapy rozwoju kwiatów i jego części służących rozmnażaniu płciowemu, takich jak: pręciki, zalążki i ich składniki (ref. [22, 32]).

Porównanie starych ewolucyjnie poliploidów, jak *Arabidopsis*, z niedawno naturalnie powstałymi poliploidami bawełny i syntetycznymi poliploidami bawełny wykazało, że ubytek DNA lub zmiany w epigenetycznej regulacji podwojonych genów są inicjowane bezpośrednio lub wkrótce po poliploidyzacji. Skutkiem poliploidyzacji może być genowo-specyficzne lub regionalne wyciszenie genów indukowane epigenetycznie w wyniku metylacji DNA i histonów, wmontowanie sekwencji kodujących do nieaktywnej transkrypcyjnie, trwale skondensowanej heterochromatyny i aktywacja retroelementów lub działanie iRNA [41], (ref. [1, 37]). W świetle dotychczasowych danych obecnie przyjmuje się, że wyciszenie pewnych genów jest procesem sterowanym, dla innych – przypadkowym. Wyciszenie zduplikowanych genów u poliploidów jest wyjaśniane rozmaicie. Wydaje się, że istotnym mechanizmem jest zachowanie odpowiedniej dawki genów [1]. Zjawisko wyciszenia podwojonych genów jest istotnym elementem ewolucji poliploidów [1].

## 4. UDZIAŁ SEKWENCJI POWTARZALNYCH W MODYFIKACJI ROZMIARÓW GENOMÓW

Wspomniane we Wstępie prace Flavella i jego zespołu [12, 13] wykazały wielokrotnie potwierdzalne istnienie korelacji między rozmiarami genomu i ilością sekwencji powtarzalnych. Wkrótce okazało się, że przeważająca liczba sekwencji powtarzalnych to rozmaite kategorie ruchomych elementów, które zasiedliły genomy jądrowe Eukaryota. Wśród tych elementów jedną z grup stanowią retrotranspozony długości od 700 pz do 15 kpz, oflankowane długimi powtórzeniami terminalnymi – LTR-ami (ang. *Long Terminal Repeats*, ref. [37, 40]). Ich udział w genomach roślin okrytozalążkowych jest znaczny; np. u kukurydzy stanowi aż 70% (ref. [7]). Podane poniżej dane o udziale sekwencji powtarzalnych w ewolucji rozmiarów genomów zostały ograniczone do retrotranspozonów z LTR-ami oraz do jednej grupy niekodujących sekwencji (CNS), ponieważ tym sekwencjom powtarzalnym poświęcono najwięcej uwagi w związku z ich udziałem w modyfikacji rozmiarów genomów.

### 4.1. Retrotranspozony z długimi powtórzeniami terminalnymi (LTR)

Retrotranspozony z LTR-ami są szczególnie dogodnym obiektem badań udziału i przemian ruchomych elementów, ponieważ są one liczne i obecne we wszystkich częściach genomu jądrowego (w heterochromatynie, regionach przycentromerowych mogą znajdować się między genami lub być przez nie otoczone). Zmiany zachodzące w retrotranspozonach mogą być wykorzystane w rekonstrukcji tych elementów u gatunków ancestralnych, z których pochodzą genomy zawierające retrotranspozony z LTR-ami we współczesnych populacjach. Retrotranspozony z LTR-ami mają charakterystyczne cechy, które ułatwiają ich identyfikację i umożliwiają wykrywanie mutacji. Zmutowane retrotranspozony nie ulegają eliminacji w wyniku naturalnej selekcji. Dzięki przeprowadzeniu analizy mutacji można było stwierdzić, że u *Arabidopsis* i 6 gatunków roślin uprawnych wiek tych retroelementów wynosi ok. 3 miliony lat [7].

Zwiększenie liczby retroelementów w genomie – poza procesem poliploidyzacji – odbywa się poprzez ich amplifikację. Amplifikacja jest uwarunkowana przejściem retroelementów ze stanu nieaktywnego w aktywny i przyczynia się do zwiększenia rozmiarów genomu. Redukcja liczby retroelementów z LTR-ami następuje w wyniku delecji. Delecje te powstają w rezultacie nierównej homologicznej rekombinacji (ang. *unequal homologous recombination*), tzn. procesu, podczas którego nie w pełni wymieniane są odcinki DNA, oraz nieuprawnionej rekombinacji (ang. *illegitimate recombination*), tj. wymiany odcinków niehomologicznych. Jednym z produktów nieuprawnionej rekombinacji jest kolista retrotranspozon, który zawiera tylko jeden LTR; kolista retrotranspozon zwykle jest degradowany i usuwany z genomu (ref. [6]). U *Arabidopsis* w wyniku pojedynczej delecji może nastąpić ubytek od 10 do 3766 pz w obrębie wewnętrznej części retrotranspozonu z LTR-ami. Dłuższe delecje – rzędu 1 kpz – nie są powszechne. Wydaje się zatem, że akumulacja bardzo licznych, krótkich delecji jest odpowiedzialna za fragmentację większości retrotranspozonów z LTR-ami.

U ryżu średnie rozmiary delecji były rzędu 41 i 318 pz; przyjęto, że tą drogą zostało usuniętych w ciągu minionych 5 milionów lat 190 Mpz [7]. Półokres trwania retrotranspozonów z LTR-ami u ryżu jest krótszy niż 3 miliony lat, a jeszcze dawniej został usunięty retrotranspozon z LTR-ami o długości powyżej 194 Mpz. Amplifikacja i usuwanie retroelementów trwa nadal (ref. [6], por. także rozdz. 6.).

Chociaż mechanizmy molekularne decydujące o amplifikacji lub eliminacji retrotranspozonów (szczegółowo omówione w artykule przeglądowym [7]) są w znacznej mierze poznane, dotąd nie wiadomo, dlaczego w ewolucji jednych gatunków następuje zwiększenie rozmiarów genomu poprzez zwiększenie udziału retroelementów, u innych – redukcja jego rozmiarów w wyniku delecji. Jest możliwe, że procesy te są regulowane przez czynniki środowiskowe powodujące selekcję w odpowiednim kierunku (por. rozdz. 6.).

#### 4.2. Konserwatywne niekodujące sekwencje

W modelach ewolucji genów w związku z podwajaniem genomu (poliploidyzacją) przewiduje się, że funkcjonalna dywergencja, czyli subfunkcjonalizacja zduplikowanych genów (por. rozdz. 3.) jest spowodowana przez utratę elementów regulatorowych. Domniemanymi elementami regulatorowymi są konserwatywne niekodujące sekwencje zwane CNS-ami (ang. *Conserved Non-coding Sequences*). Są to krótkie odcinki DNA zachowane między gatunkami (dlatego konserwatywne). Znajdują się one głównie powyżej regionu regulatorowego [28]. U roślin liczba CNS-ów i ich długość są znacznie mniejsze niż u ssaków, co jest związane z o wiele bardziej licznymi rundami poliploidyzacji. Kolejne podwojenia genomów stanowią okazję do powstania subfunkcjonalizacji genów, co potencjalnie powoduje utratę CNS-ów przypadających na jeden gen. O słuszności tego twierdzenia świadczy porównanie liczby rodzin genowych, tj. zawierających geny paralogiczne (pochodzące od wspólnego przodka) u roślin i zwierząt. Tylko 35% genów u *Arabidopsis* jest w pojedynczych kopiach; u człowieka takie geny stanowią aż 86%. U *Arabidopsis* ponad 37% genów należy do rodzin genowych składających się z 5 lub więcej członków; u człowieka – zaledwie 1,4% (ref. [28]).

Paradoksalnie, subfunkcjonalizacja po duplikacji może prowadzić do względnie prostych regionów regulatorowych przypadających na jeden gen. U kukurydzy i ryżu na jeden gen przypadają średnio trzy CNS-y, ale brak jest CNS-ów w 27% zbadanych genów. Geny ssaków mają średnio 17,7 CNS-ów. Długość CNS-ów w obrębie genów ortologicznych (mimo odmiennej sekwencji DNA kodujących białka o takiej samej funkcji fizjologicznej) u roślin wynosi poniżej 12 pz, przy czym żaden z poznanych dotąd nie był dłuższy niż 60 pz. U ssaków długość CNS-ów zawiera się w granicach od 60 do 100 pz (ref. [28]). Względna prostota regionów regulatorowych u roślin mogłaby odzwierciedlać różnice w złożoności zarówno samych organizmów, jak i ich rozwoju.

Przytoczone dane wskazują, że u roślin jednym z procesów przyczyniających się do zmniejszania rozmiarów genomu mogłaby być redukcja liczby i długości CNS-ów.

## 5. ZMIENNOŚĆ I EWOLUCJA GENOMÓW I ICH ROZMIARÓW WŚRÓD SPOKREWNIONYCH GATUNKÓW I RODZAJÓW

Opisane wyżej przemiany spowodowane bezpośrednio przez poliploidyzację oraz inwazję ruchomych elementów i ich modyfikacje powodują przebudowę (rearanżację) genomów, której skutkiem mogą być zmiany rozmiarów genomów, głównie w wyniku amplifikacji i delecji ruchomych elementów (odpowiednio zwiększenie lub zmniejszenie zawartości DNA). Rośliny stanowią niezwykle dogodny obiekt do badań zmienności genomu. W porównaniu z analogicznie złożonymi organizmami, jakimi są ssaki, u roślin następują liczniejsze procesy powodujące zwiększenie, jak i zmniejszenie genomu oraz jego przebudowę [7].

Zmienność rozmiarów genomu w obrębie gatunku była wielokrotnie opisywana. Nasuwa się pytanie, czy różnice, szczególnie nieistotne statystycznie, nie są artefaktem, bowiem wyniki świadczące o takich modyfikacjach bywają kwestionowane. Stwierdzone różnice, często przypisywane odmianom uprawnym lub kojarzone z różnicami genotypowymi, mogą być powodowane przez stosowanie niewłaściwych metod i standardów służących do oznaczania bezwzględnej zawartości C DNA. Rezultaty krytycznej analizy kilku takich wyników uzyskanych w obrębie gatunku dowodzą, że poza błędami metodycznymi stwierdzone różnice nie były istotne statystycznie [16]. Natomiast znaczne różnice (nawet blisko dwukrotne) wartości 1C DNA w grupie osobników zaliczanych do tego samego gatunku są interpretowane jako dowód przynależności tak różniących się roślin do rozmaitych podgatunków; za argument dodatkowy uważa się różnice w morfologii i preferowanych siedliskach. Postuluje się zatem, aby wewnątrzgatunkowe różnice rozmiarów genomów konfrontować z cechami morfologicznymi [33]. Przy rozważaniu różnic w zawartości C DNA należy wziąć pod uwagę różnice w warunkach środowiskowych (por. rozdz. 6.). Wydają się nie budzić wątpliwości te wyniki badań, w których wykazano związek między zwiększeniem/zmniejszeniem rozmiarów genomów a amplifikacją/ubytkiem różnego rodzaju sekwencji powtarzalnych (ref. [36]). Obecność chromosomu/ów B w istotny sposób wpływa na rozmiary genomu oraz zgodnie z teorią nukleotypową (por. niżej) powoduje wydłużenie czasu trwania cyklu komórkowego (ref. [30]).

Wyniki sekwencjonowania DNA sklonowanych w BAC fragmentów chromosomów wskazują na istnienie w niektórych chromosomach segmentalnych duplikacji i na obecność tandemowych rodzin genów [6]. Typowe rearanżacje chromosomów w toku ewolucji genomów to translokacje oraz inwersje, powodujące różnice w strukturze chromosomów u spokrewnionych taksonów, jak np. w rodzajach *Lycopersicon* (pomidor), *Solanum* (ziemniak) i *Gossypium* (bawełna). Niewiele dotąd wiadomo o związku między skutkami genotypowymi rearanżacji chromosomów i procesem specjacji [9]. Allopoliploidy, do których należą liczne gatunki uprawne, ale i dziko rosnące, są od dawna obiektem licznych badań cytogenetycznych i molekularnych. Rearanżacja genomów u allopoliploidów może następować, przynajmniej częściowo, w wyniku aktywacji retroelementów [10]. Ostatnio szczególnie dobrze zostały poznane zmiany

w genomach gatunków allopoliploidowych w porównaniu z domniemanymi gatunkami ancestralnymi z zastosowaniem metod z zakresu cytogenetyki molekularnej – GISH (ang. *Genomic In Situ Hybridization*) i FISH (ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*).

Metoda GISH umożliwia odróżnienie u allopoliploidów chromosomów i ich fragmentów pochodzących z poszczególnych diploidalnych genomów ancestralnych. W ten sposób wykazano u niektórych gatunków allopoliploidalnych zbóż istnienie translokacji między genomami ancestralnymi (ref. [36]). W przypadku małych chromosomów u rodzaju *Brassica* istnienia tego procesu nie można było udowodnić [29]. Allotetraploidalny gatunek *Nicotiana tabacum* (tytoń,  $2n = 4x = 48$ , genom TS) powstał 5–6 milionów lat temu ze skrzyżowania dwóch gatunków diploidalnych: *N. sylvestris* ( $2n = 2x = 24$ , genom S) i *N. tomentosiformis* ( $2n = 2x = 24$ , genom T). Takie pochodzenie *N. tabacum* zostało potwierdzone przez rezultaty współczesnych krzyżówek. Wyniki GISH nie tylko pozwoliły na odróżnienie chromosomów z genomu S i T, ale również wykazały translokacje T/S i S/T [14]. Ciekawy przypadek modyfikacji chromosomów został stwierdzony u naturalnego heksaploida *Chenopodium album* (komosa biała, zwana także lebiodą,  $2n = 6x = 54$ ), u którego chromosomy są krótsze – 1,0–2,6  $\mu\text{m}$  niż u diploida ( $2n = 2x = 18$ ) – 1,4–2,7  $\mu\text{m}$ . Sonda w metodzie GISH z DNA diploidów dawała silne sygnały hybrydazyjne tylko u 18 chromosomów dłuższych; krótsze wykazywały znacznie słabsze sygnały [26].

U wymienionych gatunków allotetraploidalnych i u naturalnych poliploidów *Chenopodium album* przeprowadzono metodą FISH badania porównawcze z zastosowaniem jako sond 45S rDNA lub 25S rDNA oraz 5S rDNA w odniesieniu do diploidów ancestralnych bądź naturalnego diploida. U allotetraploidów *Brassica* wykazano m.in. modyfikacje liczby loci 5S rDNA lub 45S rDNA w porównaniu z ancestralnymi diploidami. U allotetraploidów ma miejsce bądź zmniejszenie liczby loci 5S rDNA (*B. juncea* – gorczyca etiopska, *B. napus* – w zależności od odmiany – rzepak lub brukiew) lub ich liczba stanowi sumę loci u gatunków ancestralnych (*B. carinata* – gorczyca), natomiast liczba loci 25S rDNA ulega bądź zmniejszeniu (*B. juncea*, *B. carinata*), bądź zwiększeniu (*B. napus*) lub nie ulega zmianom. Różnice liczby loci u tego samego gatunku zależą od odmiany [18, 20, 21]. Niektóre geny kodujące 45S rDNA stają się u allotetraploidów *Brassica* nieaktywne transkrypcyjnie [19]. U naturalnego allopoliploida *Arabidopsis suecica* zachodzi wyciszenie genów rRNA pochodzących z genomu jednego z diploidalnych gatunków ancestralnych – *Arabidopsis thaliana* (ref. [10]). U allotetraploida *Nicotiana tabacum* (genom ST, por. wyżej) w porównaniu z diploidami ancestralnymi (*N. sylvestris* – genom S i *N. tomentosiformis*) następuje eliminacja 45S rDNA pochodzącego z genomu S, w którym u diploida sygnał po FISH jest słabszy niż w genomie diploida z genomem T. Znaczne różnice w genomach diploidów ancestralnych dotyczą 5S rDNA. W genomach S długość jednostki powtarzalnej wynosi 431 pz, a liczba kopii – 900. W genomach T jednostka powtarzalna składa się z 644 pz i jest powtórzona 400 razy. U allotetraploida *N. tabacum* liczba kopii 5S rDNA jest zmienna w zależności od odmiany: im większa liczba kopii pochodzi z genomu S, tym mniejsza liczba kopii jest z genomu T i odwrotnie, ale zawsze liczba kopii jest większa

od sumy tych kopii u diploidów ancestralnych [14]. U wspomnianych wyżej naturalnych poliploidów *Chenopodium album* następuje wyraźna redukcja liczby *loci* kodujących rRNA. U diploida ( $2n = 18$ ) jest jedna para chromosomów z 25S rDNA i dwie pary z 5S rDNA; tetraploid ( $2n = 4x = 36$ ) ma jedną parę chromosomów z 25S rDNA i trzy pary chromosomów z *loci* 5S rDNA, u heksaploida ( $2n = 54$ ) są dwie pary chromosomów z 25S rDNA i cztery pary z 5S rDNA [26].

Poznanie rozmiarów genomów u auto- i allopoliploidów umożliwiło rozpatrywanie tej cechy genomu jako skutku poliploidyzacji. U indukowanego kolchicyną autotetraploida *Sorghum versicolor* zawartość 2C DNA – 6,67 pg – przewyższa ponad dwukrotnie (również po uwzględnieniu SE) rozmiar genomu u roślin diploidalnych – 3,25 pg [37]. U naturalnego heksaploida *Chenopodium album* ( $2n = 54$ ) w porównaniu z diploidem ( $2n = 18$ ) zawartość 2C DNA wynosi zaledwie 3,85 pg (zamiast oczekiwanego 5,4 pg) [26]. Podobnie u allotetraploida *Brassica carinata* (genom BBCC) 1C DNA wynosi 1,308 pg i jest mniejszy (także po uwzględnieniu SE) niż można oczekiwać na podstawie zsumowania diploidalnych genomów ancestralnych: *Brassica nigra* (gorczyca czarna, genom BB) – 1C DNA = 0,647 pg i *B. oleracea* (kapusta warzywna, genom CC) – 1C DNA = 0,710 pg (ref. [24]). Jedną z przyczyn redukcji rozmiarów genomu u poliploidów, stwierdzoną u *Chenopodium album*, ale niepowszechną u rodzaju *Brassica*, mogłyby być ubytek genów kodujących rRNA (por. wyżej, także skrócenie części chromosomów u komosy białej).

Szczegółowe analizy ewolucji rozmiarów genomów wśród spokrewnionych gatunków były przeprowadzane z uwzględnieniem liczby i rozmiarów chromosomów przez porównanie sekwencji ITS (ang. *Internal Transcribed Sequences* – wewnętrzne, transkrybowane sekwencje w genie 45S rRNA, usytuowane u roślin między genem kodującym 18S rRNA a 5,8S rRNA oraz między 5,8 S rRNA i 25S rRNA). Na podstawie tych właściwości dla poszczególnych gatunków są konstruowane dendrogramy, z których wyciąga się wnioski o kierunku ewolucji rozmiarów genomów w obrębie badanego rodzaju. Wielu autorów jest zdania, że ewolucja zmierza ku redukcji rozmiarów genomu. Tak jest np. w obrębie rodzaju *Sorghum* [38]. Jednak w grupie spokrewnionych gatunków innych rodzajów modyfikacje rozmiarów genomów wykazują tendencję zarówno ku jego redukcji, jak i zwiększeniu. Taka sytuacja jest wśród licznych gatunków bawełny (ref. [38]) oraz w rodzinie *Brassicaceae*, w której wszystkie zbadane pod tym względem gatunki charakteryzują się małym genomem (1C od 0,2 do maksymalnie 0,710 pg u gatunków diploidalnych) [24]. Wiele gatunków należących do tej rodziny to allopoliploidy. Przyjęto, że przodek w tej rodzinie ma najmniejszy hipotetyczny genom (1C = 0,2 pg). W rodzaju *Arabidopsis*, jeśli przyjmie się jako podstawę do analizy zmian w rozmiarach genomu zawartość DNA przypadającą na 1x chromosomów (aby ominąć różnice wynikające z poliploidyzacji), następuje zwiększenie tej wartości w porównaniu z diploidalnym gatunkiem wyjściowym – *A. thaliana* [24]. Natomiast u rodzaju *Brassica* następowało zmniejszenie genomu (przykłady podane wyżej [24]).

Bennett już w 1972 r. [3] wykazał u okrytozalążkowych roślin zielnych istnienie dodatniej korelacji między rozmiarami genomu a czasem trwania cyklu życiowego, cyklu komórkowego i mejozy, masą nasion, rozmiarami jądra i komórki (ta ostatnia

zależność nie zawsze była potwierdzana, por. [8]). Gatunki jednoroczne, a szczególnie efemerydy, u których cykl życiowy trwa zaledwie kilka tygodni, mają najmniejsze genomy, znacznie mniejsze niż gatunki dwu- i wieloletnie. Koncepcja Bennetta, dotycząca również wielu innych zależności cech roślin od rozmiaru genomu, została nazwana teorią nukleotypową. Jest ona stale uzupełniana przez nowe dowody świadczące o jej słuszności (por. [25]) i jest powszechnie akceptowana. Np. u australijskich gatunków *Sorghum* różnice w rozmiarach genomów między gatunkami jednorocznymi i wieloletnimi są dosyć znaczne: u jednorocznych średnia 2C wynosi 2,89 pg, u wieloletnich – 7,73 pg [37]. Wśród chwastów, szybko rosnące i rozwijające się gatunki (dlatego uważane za agresywne) mają mniejsze genomy niż spokrewnione gatunki niebędące chwastami.

Rozmiar genomu, poprzez tempo podziałów komórkowych i wielkość komórek, wpływa na morfologię liści i intensywność fotosyntezy. Stwierdzono istnienie negatywnej korelacji między rozmiarami genomu a wskaźnikiem nazwanym SLA (ang. *Specific Leaf Area*, tj. zależność między powierzchnią i masą liści). Niski SLA charakteryzuje gatunki z dużym genomem. U takich gatunków jest niższa intensywność fotosyntezy [25]. Te wyniki odzwierciedlają odpowiadającą im prawidłowość stwierdzoną u ptaków i ssaków, u których tempo metabolizmu jest negatywnie skorelowane z rozmiarami genomu (ref. [25, 43]).

Rośliny z dużymi genomami wydają się być ograniczone w procesie specjacji. W obrębie rodzaju istnieją mniej liczne gatunki niż wśród rodzajów z małym genomem. Stwierdzono nawet negatywną korelację między średnimi rozmiarami genomów a liczbą gatunków w obrębie rodzaju [42]. Ostatnio wykazano jednak, że u 761 rodzajów zbadanych pod tym względem istnieje zaledwie słaba negatywna korelacja między rozmiarami genomu a liczbą gatunków w danym rodzaju. Autorzy tych badań [25] podkreślają, że w tego typu analizach istnieje potencjalne źródło błędów, ponieważ niewiele wiadomo o rozmiarach genomu u gatunków ancestralnych oraz w obrębie rodzaju nie jest możliwe uwzględnienie wszystkich gatunków przynależnych do badanego rodzaju. Mimo tych zastrzeżeń, przyjęta jest sugestia, że w procesie specjacji duże genomy są ograniczone w ewolucji ze względu na nikłe lub bardzo wolne tempo dywersyfikacji; gatunki z bardzo dużymi genomami cechują się mniejszymi zdolnościami przystosowawczymi niż gatunki z małymi genomami [25] (por. rozdz. 6.).

Na podstawie przytoczonych danych można uznać, że skoro tempo rozwoju i czas trwania cyklu życiowego oraz zdolności przystosowawcze zależą, przynajmniej częściowo, od rozmiaru genomu, w ewolucji następuje selekcja w kierunku przyspieszenia rozwoju równoległe z redukcją rozmiarów genomów [16,25].

## 6. UDZIAŁ CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH W MODYFIKACJI ROZMIARÓW GENOMÓW

Nawet przy bardzo krytycznej ocenie wiarygodności wyników badań dotyczących rozmiarów genomu (por. rozdz. 5.), trzeba wziąć pod uwagę wiele danych wskazujących na istnienie wewnątrzgatunkowej zmienności tej jego cechy. Modyfikacje wielkości



genomu mogą być wynikiem czynników środowiskowych, a w szczególności klimatu, w jakim rozwijają się rośliny (ref. [31]). Należy jednak zaznaczyć, że zmiany te, tj. zwiększenie/zmniejszenie rozmiarów genomu w podobnych warunkach nie zawsze zmierzają w tym samym kierunku. Badano modyfikacje wielkości genomów u tych samych gatunków w zależności od wysokości n.p.m., szerokości geograficznej i temperatury.

Negatywną korelację między wielkością genomu i wysokością n.p.m. stwierdzono w europejskich populacjach traw: *Festuca arundinacea* (kostrzewa trzcinowa), *Dactylis glomerata* (kupkówka pospolita) i uprawnych odmian *Zea mays* (kukurydza). Wyniki te są komentowane jako efekt przewagi selekcyjnej roślin z małym genomem w ekstremalnych warunkach i krótkim okresie wegetacji, jakie panują na dużych wysokościach (ref. [31]). Jednak w obrębie 23 populacji *Zea mays* uzyskano inne wyniki: rośliny ze średnimi rozmiarami genomu występują na średnich wysokościach, a gatunki z małym genomem – zarówno na poziomie morza, jak i na wysokości 2440 m (ref. [25]).

W badaniach zależności między szerokością geograficzną a wielkością genomu stwierdzono znaczne różnice rozmiarów genomu u kukurydzy w klimacie tropikalnym; odkąd kukurydza została zaadaptowana jako roślina uprawna w Ameryce Północnej, wielkość genomu stała się czynnikiem selekcyjnym, co doprowadziło do wprowadzenia do upraw wyłącznie odmian z najmniejszym genomem w najbardziej wysuniętych na północ obszarach tego kontynentu, tj. w Kanadzie (ref. [7]). Ta tendencja wydaje się mieć charakter powszechny, sugeruje się bowiem, że gatunki okrytozależkowe z dużym genomem są stopniowo eliminowane z szerokości północnej (ref. [25]).

W rozważaniach na temat zależności między wysokością n.p.m. i szerokością geograficzną a rozmiarami genomów należy wziąć pod uwagę temperaturę. Po uwzględnieniu tego czynnika okazuje się, że gatunki z małym genomem mogą istnieć na każdej wysokości n.p.m. i szerokości geograficznej, ale gatunki z największymi genomami bywają eliminowane z warunków ekstremalnych. Ponadto stwierdzono, że gatunki z dużymi genomami nie występują w warunkach z krótkimi sezonami wegetacyjnymi [25].

Chociaż na podstawie wiedzy o roli sekwencji powtarzalnych, a szczególnie dobrze poznanych pod tym względem retrotranspozonów z LTR-ami (por. podrozdz. 4.1.) powszechnie przyjmuje się, że modyfikacje rozmiarów genomu są powodowane przez delecje (zmniejszenie rozmiaru) lub amplifikacje (zwiększenie) tych retroelementów, mało jest dotąd bezpośrednich dowodów na trafność tego poglądu w odpowiedzi roślin na warunki środowiska. U dzikiego gatunku jęczmienia *Hordeum spontaneum* wykazano trzykrotne zmniejszenie liczby kopii retrotranspozonów z LTR-ami w warunkach suszy i znacznej wysokości n.p.m.; redukcja ta przebiegała zgodnie z mechanizmami opisanymi wyżej (por. podrozdz. 4.1.) (ref. [31]).

O ograniczonej zdolności adaptacyjnej gatunków roślin z dużymi genomami świadczą wyniki badań dotyczących rozmiarów genomów u gatunków zagrożonych wyginięciem (na podstawie *World Conservation and Monitoring Centre – UNEP-WCMC*, odpowiednik Czerwonej Księgi w Polsce) wyróżniona została podgrupa gatunków zagrożonych wyginięciem w skali globalnej oraz podgrupa zagrożona w skali lokalnej. Z całej

grupy gatunków poddanych analizie wyłączono poliploidy i gatunki nie dość dobrze pod tym względem poznane. Wykazano istnienie korelacji między rozmiarami genomów a skalą zagrożenia wyginięciem. Najmniejszym genomem charakteryzują się gatunki niezagrożone, pośrednimi rozmiarami – zagrożone tylko lokalnie, natomiast gatunki z największym genomem stanowiły podgrupę zagrożonych w skali globalnej. Wśród gatunków starannie zweryfikowanych jako poliploidy, korelacja ta przedstawia się odwrotnie: poziom ploidalności jest negatywnie skorelowany z zagrożeniem wyginięciem [42].

Przytoczone wyniki sugerują, że warunki środowiskowe mogą stanowić czynniki powodujące eliminację gatunków z dużym genomem, upośledzonych pod względem zdolności adaptacyjnych, co przyczynia się do postępującej dominacji gatunków z małymi genomami. Zdolności przystosowawcze poliploidów (zapewne głównie allopoliploidów) doprowadziły do ich dominacji we współczesnej florze roślin okrytozalążkowych.

## 7. PERSPEKTYWY

Najnowsze opracowania dotyczące organizacji genomów roślin w zdecydowanej większości, co oczywiste, opierają się na szczegółowych analizach dwóch całkowicie zsekwencjonowanych genomów: *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa* [39, 44]. Oba należą do grupy gatunków z małymi genomami: *Arabidopsis thaliana* – 140 Mpz, zaś *Oryza sativa* – 400 Mpz; ich rozmiary zdecydowanie odbiegają od uśrednionej wielkości genomów roślin okrytozalążkowych ocenionej na 5600 Mpz. Trudno uznać je zatem za reprezentatywne dla królestwa roślin, co nie zmienia faktu, że szereg zaobserwowanych u nich cech, takich jak segmentalne duplikacje znacznych części genomów czy wysoki poziom amplifikacji retroelementów, wydają się być zjawiskami powszechnymi wśród roślin okrytozalążkowych (por. rozdz. 2., 4.1. i 5.).

Opracowane strategie i techniki sekwencjonowania stwarzają realne szanse poznania w najbliższym czasie genomu modelowego gatunku reprezentującego grupę o dużych genomach – *Zea mays* (*Maize Genomics Project*). Genom kukurydzy jest pod względem rozmiarów (2400–2700 Mpz) zbliżony do wielkości genomów ssaków (1400–3700 Mpz), co stwarza szersze podstawy do analiz porównawczych. Już obecna wiedza o nim wskazuje na kilka charakterystycznych cech, takich jak allotetraploidalna segmentalność czy ogromna, znacznie wyższa niż u *Arabidopsis thaliana* obfitość wysoce konserwatywnych elementów powtarzalnych (ok. 80% genomu kukurydzy i poniżej 20% u rzodkiewnika), będąca efektem szczególnie intensywnych amplifikacji zachodzących w okresie ostatnich kilku milionów lat. Nawet niepełne dane o sekwencjach genomu kukurydzy dowodzą istnienia retroelementów reprezentujących setki czy nawet tysiące ich rodzin, a geny stanowią u tego gatunku małe wyspy w morzu retrotranspozonów z LTR-ami. Tego rodzaju organizacja genomu jest znacznie bliższa większości roślin okrytozalążkowych niż typ istniejący u *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa*. Charakterystyka genomu kukurydzy dotyczy też m.in. rozmieszczenia 5-metylocytozyny.

Większość powtarzalnych elementów jest u tego gatunku, podobnie jak u ssaków, wysoce zmetylowana, podczas gdy geny, przeciwnie niż u ssaków, wydają się być głównie niezmetrylowane, nawet w tych tkankach, w których nie ulegają ekspresji.

Mimo iż genom kukurydzy jest 6 lub 7 razy większy niż ryżu, a blisko 20 razy większy niż rzodkiewnika, jest on znacznie mniejszy od genomów kilku ważnych gatunków uprawnych, np. jęczmienia – 5000 Mpz, pszenicy – 17000 Mpz, ale rozmiary genomu kukurydzy otwierają większe możliwości analiz porównawczych z genomami zwierzęcymi.

Nadzieje na szybkie poznanie pełnej sekwencji genomu *Zea mays* wynikają z doświadczeń wyniesionych z realizacji *Human Genome Project* i związane są z integracją kilku najbardziej efektywnych strategii i technik sekwencyjnych, jak WGS (*whole-genome shotgun*), GE (*gene-enrichment*) i BAC (*bacterial artificial chromosome clones*). Będą one następnie wykorzystane w analizach największych genomów roślinnych. Nie ulega wątpliwości, że uzyskane tą drogą informacje wypełnią liczne luki w aktualnej wiedzy na temat ewolucji rozmiarów genomów u roślin okrytozalążkowych.

## 8. WNIOSKI

Na podstawie większości dotąd uzyskanych danych można przyjąć, że ewolucja rozmiarów genomów u roślin okrytozalążkowych zmierza ku ich redukcji mimo licznych rund poliploidyzacji, jakiej ulegały one w odległej przeszłości. Na taką tendencję wskazuje szereg dowodów z biologii molekularnej, cytologii i cytogenetyki molekularnej, fizjologii oraz ekologii.

Podwojone sekwencje kodujące mogą być eliminowane, wyciszane lub ulec subfunkcjonalizacji, dzięki czemu następuje dywersyfikacja szlaków metabolicznych oraz zdolności do adaptacji.

O wielkości genomu decyduje głównie zawartość rozmaitego rodzaju sekwencji powtarzalnych. Inwazja retroelementów oraz ich liczba, długość i modyfikacje są uznawane za czynniki regulujące rozmiary genomu. Amplifikacja retroelementów powoduje zwiększenie rozmiaru genomu, zaś delecje – jego zmniejszenie. U naturalnych auto- i allopoliploidów rozmiary genomu są mniejsze niż suma wielkości genomów ancestralnych, czemu może towarzyszyć redukcja liczby *loci* kodujących rRNA.

W porównaniu z małymi genomami, największe wykazują wolne tempo dywersyfikacji i są ograniczone ewolucyjnie wskutek mniejszych zdolności przystosowawczych. Diploidalne gatunki z dużymi genomami są bardziej narażone na wyginięcie niż diploidalne gatunki z małymi genomami. Gatunki z małymi genomami mogą istnieć w środowiskach o dużej zmienności warunków klimatycznych i krańcowo niekorzystnych dla wegetacji, ponieważ charakteryzują się one krótkim cyklem życiowym i większą intensywnością fotosyntezy. W obrębie tego samego rodzaju gatunki jednoroczne i efemerydy mają mniejsze genomy niż byliny.

## LITERATURA

- [1] ADAMS KL, WENDEL JF. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 135–141.
- [2] ADAMS KL, WENDEL JF. Novel patterns of gene expression in plants. *Trends Genet* 2005; **10**: 539–543.
- [3] BENNETT MD. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous species. *Proc R Soc London*, ser. B 1972; **181**: 109–135.
- [4] BENNETT MD, LEITCH IJ. Plant genome size research: a field in focus. *Ann Bot* 2005; **95**: 1–6.
- [5] BENNETT MD, LEITCH IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Ann Bot* 2005; **95**: 45–90.
- [6] BENNETZEN JL. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 621–627.
- [7] BENNETZEN JL, DEVOS KM. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot* 2005; **95**: 127–132.
- [8] CAVALIER-SMITH T. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Ann Bot* 2005; **95**: 147–175.
- [9] COGHLAN A, EICULER EE, OLIVER SG, PATERSON AH, STEIN L. Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends Genet* 2005; **21**: 673–682.
- [10] COMAI L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 387–399.
- [11] DOLEŽEL J, BARTOŠ J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot* 2005; **95**: 99–110.
- [12] FLAVELL RB. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans R Soc London* ser. B 1986; **312**: 227–242.
- [13] FLAVELL RB, BENNETT MD, SMITH JB, SMITH DB. Genome size and proportion of repeated nucleotide DNA sequences in plants. *Biochem Genet* 1974; **12**: 257–269.
- [14] FULNEČEK J, LIM KY, LEITCH AR, KOVARIK A, MATYAŠEK R. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity* 2002; **88**: 19–25.
- [15] GREGORY TR. C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and appeal of partnership. *Ann Bot* 2005; **95**: 133–146.
- [16] GREILHUBER J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann Bot* 2005; **95**: 91–98.
- [17] GREILHUBER J, DOLEŽEL J, LYSAK MA, BENNETT MD. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* 2005; **95**: 255–260.
- [18] HASTEROK R, JENKINS G, LANGDON T, JONES N, MALUSZYNSKA J. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor Appl Genet* 2001; **103**: 486–490.
- [19] HASTEROK R, MALUSZYNSKA J. Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. *Genome* 2000; **43**: 574–579.
- [20] HASTEROK R, MALUSZYNSKA J. Cytogenetic markers of *Brassica napus* chromosomes. *J Appl Genet* 2000; **41**: 1–9.
- [21] HASTEROK R, WOLNY E, HOSIAWA M, KOWALCZYK M, KULAK-KSIAZCZYK S, KSIAZCZYK T, HENEEN W, MALUSZYNSKA J. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of *Brassicaceae*. *Ann Bot* 2006; **97**: 205–216.
- [22] IRIS VF, LITT A. Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployments. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 454–460.
- [23] JOHNSTON JS, BENNETT MD, RAYBURN LR, GALBRAITH DW, PRICE HJ. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am J Bot* 1999; **86**: 609–613.
- [24] JOHNSTON JP, PEPPER AE, HALL AE, CHEN ZJ, HODNETT G, DRABEK J, LOPEZ R, PRICE HJ. Evolution of genome size in *Brassicaceae*. *Ann Bot* 2005; **95**: 229–235.
- [25] KNIGHT CA, MOLINARI NA, PETROV DA. The large genome constraint hypothesis: evaluation, ecology and phenotype. *Ann Bot* 2005; **95**: 177–190.
- [26] KOLANO B, MALUSZYNSKA J, SIWINSKA D. Molecular and cytogenetic analysis of genome structure in *Chenopodium album* complex. W: Prus-Głowacki W, Pawlaczek EM [red.] Variability and Evolution – New Perspectives. Poznań, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Ser. Biol. Nr 72 2005: 507–517.

- [27] LEITCH IJ, SOLTIS DE, SOLTIS PS, BENNETT MD. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Ann Bot* 2005; **95**: 207–217.
- [28] LOCKTON S, GAUT BS. Plant conserved non-coding sequences and paralogous evolution. *Trends Genet* 2005; **21**: 60–65.
- [29] MAŁUSZYŃSKA J, HASTEROK R. Identification of individual chromosomes and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH. *Cytogenet Genome Res* 2005; **109**: 310–314.
- [30] MAŁUSZYŃSKA J. Chromosom B – pasożyt czy składnik funkcjonalny genomu? *Post Biol Kom* 1994; **21**: 15–26.
- [31] MAŁUSZYŃSKA J, SIWIŃSKA D. Wielkość genomu roślinnego. *Post Biol Kom* 2004; 31, Supl. **31**: 101–114.
- [32] MOORE RC, PURUGGANAN MD. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 122–128.
- [33] MURRAY BG. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? *Ann Bot* 2005; **95**: 119–125.
- [34] NOIROT M, BARRE P, LOUARN J, DUPERRAY C, HAMON S. Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. *Ann Bot* 2002; **89**: 385–389.
- [35] NOIROT M, BARRE P, DUPERRAY C, HAMON S, DE KOCHKO A. Investigation on the causes of stoichiometric error in genome size estimation using heat experiments: consequences on data interpretation. *Ann Bot* 2005; **95**: 111–118.
- [36] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych i ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 197–218.
- [37] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Budowa genomu jądrowego. W: Olszewska MJ [red.] Podstawy cytogenetyki roślin. wyd. II. PWN Warszawa 2005: 13–55.
- [38] PRICE HJ, DILLON SL, HODNETT G, ROONEY WL, ROSS L, JOHNSTON JS. Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). *Ann Bot* 2005; **95**: 219–227.
- [39] RABINOWICZ PD, BENNETZEN JL. The maize genome as a model for efficient sequence analysis of large plant genome. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 149–156.
- [40] SAKOWICZ T. Analiza molekularna niektórych powtarzalnych wybranych gatunków *Vicia*. Wydawn. Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź: 2003.
- [41] WESSLER SR, CARRINGTON JC. Genome studies and molecular genetics. The consequence of gene and genome duplication in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 119–121.
- [42] VINOGRADOV AE. Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Red list. *Trends Genet* 2003; **19**: 609–614.
- [43] VINOGRADOV AE. Evolution of genome size: multilevel selection, mutation bias or dynamical chaos? *Curr Opin Genet Develop* 2004; **14**: 620–626.
- [44] THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 796–815.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 04.04. 2006 r.

Przyjęto: 11.05. 2006 r.

Banacha 12/16, 90-237 Łódź



## ZABURZENIA FUNKCJI LAMIN A PATOFIZJOLOGIA LAMINOPATII

### AFFLICTIONS OF LAMINS' FUNCTIONS AND THE PATHOPHYSIOLOGY OF LAMINOPATHIES

Anna LITWINIEC, Alina GRZANKA, Aleksandra STĘPIEŃ

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Streszczenie:* Lamininy są elementami struktury jądra komórkowego, wpływającymi nie tylko na organizację i integralność otoczki jądrowej, ale także na procesy niezbędne dla zachowania i przetwarzania materiału genetycznego. Stąd, zaburzenia ich funkcji na skutek mutacji skupionych w różnych rejonach cząsteczki białka mogą mieć poważne konsekwencje dla utrzymania właściwej liczby oraz aktywności komórek w określonych tkankach. Od czasu zidentyfikowania i powiązania defektów lamin z szeregiem zespołów chorobowych trwają prace mające na celu wyjaśnienie tkankowo-specyficznych mechanizmów patofizjologii w poszczególnych syndromach. W rezultacie tych badań powstają różnorodne hipotezy, których weryfikacja wymaga uprzedniego poznania i uwzględnienia funkcji lamin oraz oddziałujących z nimi czynników.

*Słowa kluczowe:* lamininy, laminopatie, blaszka jądrowa, emeryna.

*Summary:* Lamins are components of nucleus, which not only influence organization and integrity of nuclear envelope, but are also essential for the maintenance and processing of genetic material. Therefore, disturbance of their functioning as a result of mutations in various regions of the protein molecule can have serious consequences for the number and activity of cells in various tissues. Since identifying lamin defects as important factors in a vast range of diseases, research aimed at elucidation of tissue-specific mechanisms in the pathophysiology of particular syndroms has been in progress. Various hypotheses have been proposed; their verification requires knowledge of all the functions and interactions involving lamins and their binding partners.

*Keywords:* lamins, laminopathies, nuclear lamina, emeryne.

*Wykaz skrótów:* **NLS** – sekwencja decydująca o lokalizacji białka w jądrze komórkowym, **CaaX** – motyw sekwencji aminokwasów: cysteina – dwie reszty alifatyczne – dowolna reszta, **MAN1** – białko wewnętrznej błony jądra uczestniczące w szlakach sygnałowych dla TGF $\beta$  (transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ ), **LBR** – receptor lamininy B, **LAP1**, **LAP2 $\beta$** , **LAP2 $\alpha$**  – polipeptydy zasocjowane z blaszką -1,-2 $\beta$ ,-2 $\alpha$ , **nesprin1- $\alpha$**  – białko wewnętrznej membrany jądra wiążące laminę A i emerynę, **UNC-84** – białko *C. elegans* niezbędne dla migracji i umiejscowienia jądra, lokalizacja tego białka jest zależna od

laminy **YA** (*Young Arrest*) – białko *Drosophila*, wiążące laminę Dm i chromatynę, **p34cdc2** – kinaza fosforylująca laminy i przez to sprzyjająca rozproszeniu otoczki jądrowej, **MOK2** – czynnik transkrypcyjny zawierający motywy palców cynkowych, oddziałujący z laminami A/C, **pRB** – białko retinoblastomy, **BAF** – czynnik oddziałujący z DNA (m.in. zapobiega integracji DNA retrowirusowego) oraz z białkami zawierającymi domenę LEM (LAP2, emeryna, MAN1), **SREBP** – czynnik transkrypcyjny istotny dla różnicowania adipocytów, **MAD** – dysplazja żuchwowo-obojęczykowa, **EDMD** – dystrofia mięśniowa Emery'ego-Dreifussa, **DCM** – idiopatyczna kardiomiopatia rozstrzeniowa, **LGMD1B** – obciążeniowo-kończynowa dystrofia typu 1B, **FPLD** – rodzinna lipodystrofia typu Dunningana, **CMT2B1** – choroba Charcot-Marie-Tooth 2B1, **HGPS** – zespół progerii Hutchinsona-Gilforda, **RD** – dermatopatia restrykcyjna, **HEM** – dysplazja szkieletowa Greenberga, **PHA** – anomalia Pelger-Huët, **BOS** – zespół Buschke-Ollendorff, **X-EDMD** – dystrofia mięśniowa Emery'ego-Dreifussa związana z mutacją genu emeryny (zlokalizowanego na chromosomie X), **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny pełniący funkcję antyapoptotyczną w komórkach poddanych stresowi mechanicznemu.

## 1. WPROWADZENIE

Laminy są głównymi komponentami blaszki jądrowej, która występuje w postaci włóknistej sieci wyściełającej powierzchnię wewnętrzną błony jądrowej od strony nukleoplazmy, zapewniając tym samym strukturalny zrab dla otoczki jądrowej [24, 81]. Składniki blaszki uczestniczą nie tylko w oddziaływaniach z integralnymi białkami wewnętrzną błony jądra, ale także wykazują skłonności do wiązania chromatyny [24, 69, 80, 92]. Poza tym typowym miejscem lokalizacji jądrowej stwierdzono również obecność lamin w skupieniach nukleoplazmatycznych, które mogą stanowić miejsca ich składania, modyfikacji bądź też replikacji DNA [48, 54, 57]. Istnieją doniesienia sugerujące, że białka te tworzą w nukleoplazmie dynamiczne struktury o wyższym poziomie uporządkowania, przypominające sieć umożliwiającą kompartmentację wewnętrzną przestrzeni jądra i prawidłową organizację procesów zachodzących na jego terytorium [42, 54, 74]. Wraz z poznawaniem wciąż nowych aspektów udziału lamin w różnorodnych procesach na terenie jądra, a zwłaszcza pod wpływem odkryć szeregu ich mutacji towarzyszących powiększającej się grupie opisanych chorób, białka te stały się jednymi z najintensywniej badanych elementów strukturalnych jądra [73]. To szczególne zainteresowanie odzwierciedlają liczne próby interpretacji mechanizmów, na skutek których defekty lamin lub oddziałujących z nimi czynników przyczyniają się do patofizjologii stanów chorobowych [4, 6, 39, 52].

## 2. LAMINY

### 2.1. Cechy wyróżniające laminy na tle innych filamentów pośrednich

Ze względu na unikalne właściwości, laminy zostały zaklasyfikowane do typu V w obrębie filamentów pośrednich [8, 81]. Omawiane białka kręgowców wyróżniają się szczególnie ze względu na większe zbieżności sekwencyjne w stosunku do cytoplazmatycznych filamentów pośrednich bezkręgowców niż kręgowców. W związku z tym

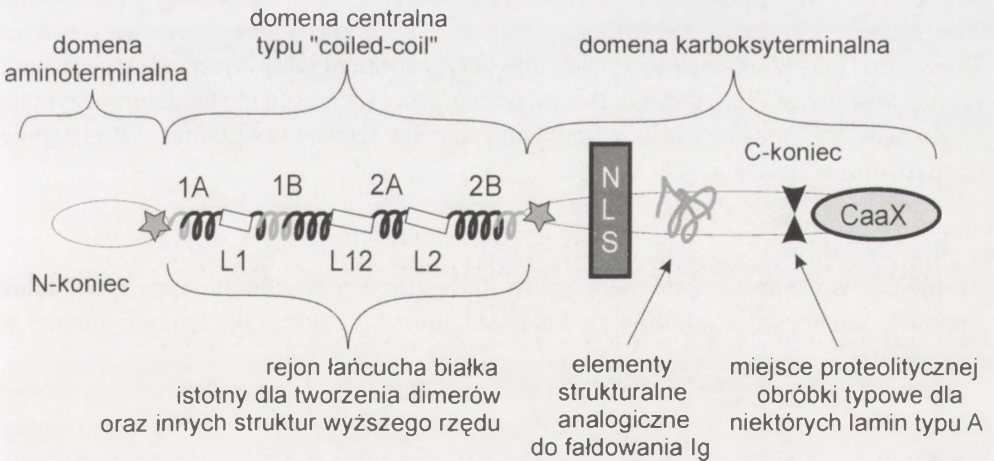


uważa się, że wyodrębniły się na wczesnych etapach filogenezy – jako formy prekursorowe swoich odpowiedników cytoplazmatycznych [24, 38]. Cechy charakterystyczne dotyczą przede wszystkim obecności dodatkowych 42 reszt aminokwasowych tworzących 6 heptad zwoju 1B, sekwencji lokalizacji jądrowej NLS domeny karboksyterminalnej, jak również, w większości przypadków (za wyjątkiem lamin C), motywu C-końca CaaX podlegającego obróbce potranslacyjnej [24, 38] (ryc. 1).

## 2.2. Opis struktury cząsteczki z zaznaczeniem rejonów konserwatywnych

*Chodzi o rejonny konserwatywne pod względem układu aminokwasów oraz funkcjonalnie istotnych domen, w obrębie których mutacje mogą przyczynić się do wykształcenia laminopatii.*

Centralnym elementem strukturalnym lamin, podobnie jak pozostałych filamentów pośrednich, jest domena typu „coiled-coil”, zawierająca cztery  $\alpha$ -helikalne segmenty (1A, 1B, 2A i 2B) przedzielone odpowiednimi odcinkami łącznikowymi (L1, L12 i L2) [76] (ryc.1). Natomiast jej obszary karboksy- i aminoterminalne odznaczają się wyraźnie wyższymi poziomami sekwencyjnego konserwatywności w porównaniu z pozostałymi fragmentami cząsteczki. Te składające się z około 30 aminokwasów rejonny mają prawdopodobnie decydujące znaczenie dla prawidłowego formowania struktur wyższego rzędu, takich jak oligomery czy liniowe polimery [81]. Na podstawie analiz sekwencyj-



RYCINA 1. Schemat przedstawiający strukturę lamin z zaznaczeniem wybranych elementów funkcjonalnie istotnych, szczególnie dla lamin typu A. Zgodnie z [73, 81], zmodyfikowany. W domenie centralnej (typu „coiled-coil”) widoczne helikalne segmenty przedzielone odcinkami łącznikowymi. Na krańcach domeny centralnej jaśniejszy kolor odpowiada rejonom znacznego konserwatywności (o wysokiej homologii sekwencji aminokwasowej wśród lamin), uczestniczącym w tworzeniu struktur wyższego rzędu; w segmencie 1B wyróżniono dodatkowe 42 reszty aminokwasowe w stosunku do filamentów pośrednich kręgowców. Gwiazdką oznaczono miejsca fosforylacji, niezbędnej dla rozpraszania sieci lamin, np. podczas mitozy. Wyróżniono również elementy fałdowania typowego dla immunoglobulin obecne w domenie C-końcowej lamin typu A. NLS – sygnał lokalizacji jądrowej, CaaX – motyw sekwencyjny istotny dla właściwej lokalizacji w otoczonej jądrowej (nie występuje w laminie C ssaczej i *Drosophila*)

nych wynioskowano o umiejscowieniu domeny centralnej (ok. 40 kDa) między dwoma odcinkami: N-końcowym (ok. 30 reszt aminokwasowych) i C-końcowym (ok. 20 kDa) [41] (ryc. 1). Unikalne różnice strukturalne skupiają się głównie w obrębie tych właśnie domen o skrajnych pozycjach w łańcuchu białka [76], jednakże Dhe-Paganon i in. (2002) zidentyfikowali, poza domeną centralną, odrębny, zlokalizowany w pobliżu C-końca region o wysokiej homologii wśród kręgowców i bezkręgowców [13]. Stwierdzono, że C-terminalna domena lamin A/C przyjmuje strukturę przestrzenną podobną do fałdowania immunoglobulin, obejmując 9 łańcuchów tworzących układy  $\beta$ -harmonijek, połączonych ze sobą kilkoma pętlami [13, 41] (ryc. 1). Dwa z łańcuchów składowych są charakterystyczne wyłącznie dla lamin [41]. Powstawanie przejściowych mostków dwusiarczkowych oraz znaczna elastyczność tej domeny mogą odzwierciedlać jej natywne właściwości, istotne dla dostosowywania konformacji do oddziaływań z różnorodnymi czynnikami biologicznymi [41]. Zaburzenia takich interakcji, czy też zmiany struktury oraz stabilności białek powstałe w wyniku specyficznych mutacji globularnego C-końca ludzkich lamin A/C są przyczyną laminopatii – kardiomiopatii rozstrzeniowej, dystrofii mięśniowych oraz lipodystrofii [13, 41]. Niektóre schorzenia tego typu mogą jednakże towarzyszyć mutacjom N-końca, jak również domeny centralnej lamin A/C [23, 41] (ryc. 3).

W obrębie ostatniego z wymienionych obszarów aminokwasy hydrofobowe, polarne i obdarzone ładunkiem tworzą regularne układy heptadowych powtórzeń, umożliwiając owinięcie dwóch podjednostek  $\alpha$ -helikalnych równolegle wokół siebie [81]. Uformowane w ten sposób dwuniciowe zwoje mogą z kolei łączyć się do postaci oligomerów i struktur wyższego rzędu dzięki stabilizującym oddziaływaniom między bocznymi łańcuchami aminokwasowymi [72, 81]. Dodatkowo, domeny N- i C-terminalne lamin przyczyniają się do asocjacji bocznej tetramerycznych protofilamentów w oktamer, a następnie typowe filamenty 10-nm [74, 81].

### 2.3. Klasyfikacja lamin

Różnice w ekspresji tkankowej genów kodujących poszczególne typy tych białek stanowią potencjalny czynnik wpływający na moment i zakres ujawnienia mutacji w ontogenezie.

Na podstawie odmiennych właściwości, a zwłaszcza sekwencji pierwszorzędowej laminy są klasyfikowane jako przynależne do A- bądź B-typu [54]. Różnice między wyodrębnionymi grupami dotyczą także wartości punktu izoelektrycznego (neutralny dla lamin typu A, kwaśny dla typu B) oraz zachowania tych białek podczas mitozy w momencie przejściowej dezorganizacji blaszki jądrowej (rozproszenie pierwszych, a jednocześnie łączenie z błoną siateczki śródplazmatycznej tych drugich) [27, 81, 85]. Ewolucji zwierząt tkankowych towarzyszył równocześnie wzrost liczby i złożoności genów kodujących laminy [24]. Organizmy o niższym poziomie organizacji, a jednocześnie mniejszej różnorodności poszczególnych typów tych białek (tj. *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) stanowią doskonałe obiekty do badań modelowych poświęconych funkcji lamin, których występowania nie stwierdzono z kolei w komórkach drożdży i roślin [8, 36]. Lamin typu B kręgowców, takie jak: lamina B1, B2 i B3

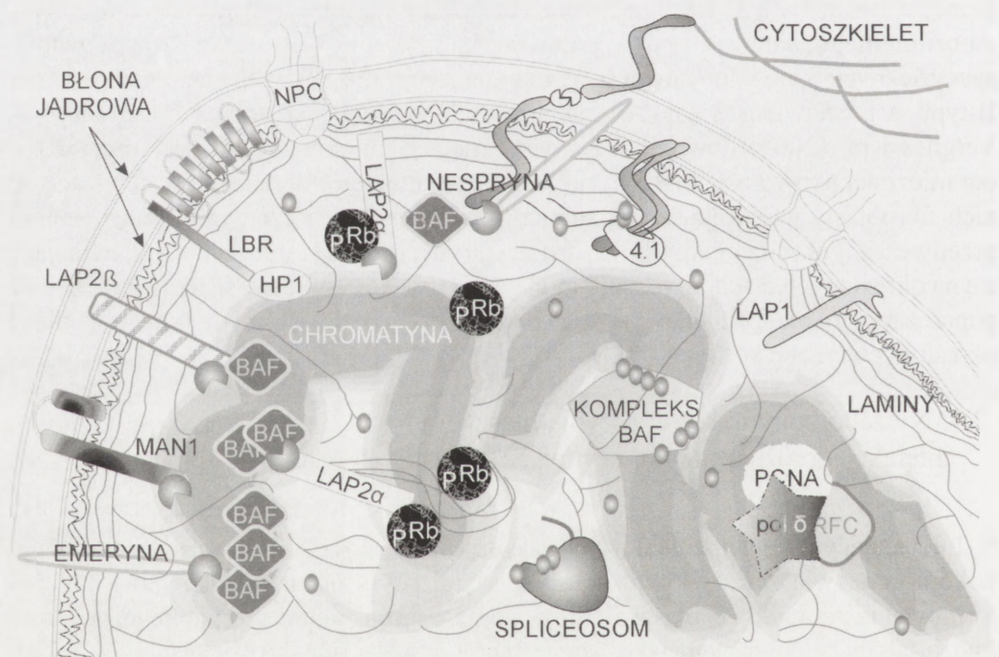
powstają na bazie dwóch odrębnych genów – stosownie do tego *Lmnb1* koduje pierwsze z wymienionych białek, a *Lmnb2* – dwa pozostałe. Z kolei laminy typu A, a mianowicie: lamina A, C, C2 i AΔ10 są produktami alternatywnego składowania pre-mRNA pochodzącego z pojedynczego genu *Lmna* [28, 81]. Różnice sekwencyjne między najbardziej rozpowszechnionymi laminami omawianego typu skupiają się w rejonie C-terminalnym cząsteczki; lamina A ma 90-aminokwasowy odcinek nieobecny w łańcuchu laminy C, która z kolei zawiera 5 unikalnych aminokwasów [69]. Specyficzne izotypy spośród obu typów ulegają ekspresji w komórkach somatycznych, inne – jedynie w komórkach płciowych [34, 84], np. lamina C2 jest białkiem mysich spermatocytów [81], natomiast lamina B3 występuje w oocytach i na wczesnych etapach życia zarodkowego *Xenopus* [69].

Poza tym, w poszczególnych typach komórek wraz z rozwojem organizmu następują zmiany ekspresji genów kodujących te białka. Podczas gdy obecność przynajmniej jednej z lamin typu B jest konieczna począwszy już od wczesnych etapów życia embrionalnego, laminy typu A pojawiają się później – w trakcie różnicowania specyficznych tkanek lub nawet po jego ukończeniu [24, 72]. Chociaż mutacje lamin B-typu, w przeciwieństwie do A-typu, nie zostały opisane jako przyczyny laminopatii, Vergnes i in. (2004) dowiedli, że myszy mające zmutowaną formę laminy B1 o ograniczonej aktywności przeżywają jedynie stadium embrionalne, a pochodzące od nich fibroblasty wykazują szereg anomalii, włącznie z zaburzeniami różnicowania i przedwczesnym starzeniem [85]. Z drugiej strony, mutacje lamin typu A ujawniające się na określonych etapach rozwoju mogą wywoływać tkankowo-specyficzne objawy poprzez modyfikację oddziaływań tych białek z czynnikami istotnymi funkcjonalnie w określonych typach komórek [9].

#### 2.4. Niezaburzony układ w obrębie blaszki jądrowej, ale również prawidłowe interakcje z różnorodnymi czynnikami – warunki właściwej funkcji lamin w komórce

Interesującym zagadnieniem wydaje się lokalizacja poszczególnych izotypów lamin w komórce, zwłaszcza w kontekście ich organizacyjnego uporządkowania podczas formowania prawidłowej blaszki jądrowej oraz współdziałania wzajemnego, ale także z pozostałymi komponentami wewnętrznej błony jądrowej i innymi czynnikami. W liniach komórkowych o obniżonym poziomie ekspresji laminy A (bądź jej braku) zaobserwowano zmienioną dystrybucję znacznej frakcji laminy C oraz emeryny, które podlegały akumulacji, odpowiednio: w jąderku i siateczce śródplazmatycznej [83]. W tych warunkach, spośród wszystkich przetestowanych izotypów, jedynie transfekcja komórek laminą A skutkowała odwróceniem nietypowego rozmieszczenia analizowanych białek. Jednocześnie wykazano, iż zmutowane formy laminy B1 mogą wpływać na wzmożone przemieszczanie lamin A i C oraz emeryny z obszarów peryferycznych jądra do nukleoplazmy [83]. Wyniki tych badań sugerują zatem wyraźną hierarchiczną asocjację elementów składowych w obrębie otoczki jądrowej. Konsekwentnie, inkorporacja laminy A do blaszki następuje za pośrednictwem lamin typu B i warunkuje dalsze połączenia z laminą C, która z kolei oddziałuje z emeryną. Zgodne z tym pozostają wskazania, że w

mutacjach lamin typu A związanych z wybranymi laminopatiami zaburzenia lokalizacji szczególnie często dotyczą laminy C, której prawidłowe umiejscowienie jądrowe jest prawdopodobnie warunkowane większą liczbą międzybiałkowych interakcji w porównaniu z pozostałymi laminami [67]. Z drugiej strony, wyniki najnowszych badań na fibroblastach mysich mających tylko laminę C sugerują, że obecność laminy A nie jest konieczna dla właściwej lokalizacji laminy C i emeryny [20]. Niemniej jednak, rozważając wszelkie procesy zachodzące z udziałem omawianych białek, warto pamiętać, że tworzą one skomplikowaną sieć wielopoziomowych i wzajemnych zależności wraz z ogromną liczbą czynników, wśród których wciąż identyfikowane są nowe [14, 27] (ryc. 2). Określenie całokształtu oddziaływań wymaga równocześnie uwzględnienia nie tylko specyfiki danego typu komórek [67], ale także pozostałych warunków, np. fazy cyklu komórkowego oraz potencjalnego udziału nowo poznawanych składników otoczki



RYCINA 2. Schemat obrazujący szereg interakcji zachodzących na terenie jądra z udziałem lamin. Zgodnie z [19, 64, 73], zmodyfikowany. Laminy przedstawione w postaci długich nici tworzących blaszkę jądrową, ale także widoczne na terenie nukleoplazmy. Uwzględniono oddziaływania lamin z różnorodnymi czynnikami biologicznymi, w tym z białkami mającymi domenę LEM (LAP2, emeryna, MAN1) (oznaczona w postaci ciemnego wycinka koła) oraz udział w procesach związanych z przetwarzaniem materiału genetycznego (kompleks BAF; kompleks replikacyjny – PCNA, polimeraza  $\delta$ , RFC; spliceosom). Aktyne oznaczono jako drobne obiekty owalne. Połączenie laminy-nespryna-cytoskielet z udziałem białek mających domenę SUN (jasne wycinki koła w przestrzeni międzybłonowej) i emeryny zgodnie z [87], zmodyfikowane. NPC – kompleksy porów jądrowych, kompleks BAF – kompleks istotny dla dekondensacji chromatyne, 4.1 – białko 4.1, oddziałujące z nespryną i aktyną, PCNA – jądrowy antygen komórek proliferujących, RFC – czynnik replikacji C, HP1 – białko heterochromatynowe 1. Pozostałe skróty według wykazu skrótów

jądrowej [28, 36], stąd w tym zakresie wiele jeszcze pozostaje do wyjaśnienia [27]. Oprócz białek, towarzyszących błonom jądrowym oraz wykazujących skłonności do wiązania się z laminami, takich jak: emeryna, MAN1, LBR, LAP1, LAP2 $\beta$ , nesprin1- $\alpha$ , UNC-84, YA i otefina, istnieje szereg innych, uczestniczących w różnorodnego typu interakcjach z omawianymi komponentami blaszki jądrowej, m.in. dimery histonów H2A i H2B, kinaza p34cdc2, LAP2 $\alpha$ , białko MOK2, aktyna, pRB, czynnik BAF, białko SREBP oraz pewne składniki kompleksów replikacji DNA i kompleksów transkrypcyjnych zależnych od polimerazy RNA II [8, 15, 21, 27, 28, 40, 44, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 69, 70, 93] (ryc. 2). Funkcje lamin i wymienionych czynników uzupełniają się bądź są ze sobą ściśle sprzężone w procesach wzrostu, utrzymania właściwego kształtu i lokalizacji jądra [4, 28, 45, 54, 66, 84], organizacji/dezorganizacji otoczki jądrowej, w tym jej odtwarzania po ukończonej mitozie [48, 83], rozpraszania przed podziałem komórki [54] i w trakcie apoptozy [8] oraz formowania kompleksów porów jądrowych o prawidłowej morfologii [24, 32, 84]. Poza tymi zjawiskami, w których udział składników blaszki jądrowej nie wydaje się zaskakujący, laminy i oddziałujące z nimi białka uczestniczą także w integralnych na terenie jądra procesach, związanych z zachowaniem i przetwarzaniem materiału genetycznego, takich jak: organizacja struktury chromatyny i stabilizacja jej zmian towarzyszących różnicowaniu [17, 54], replikacja DNA [24, 38], transkrypcja [15, 59, 78]. Dodatkowo laminy mogą pośredniczyć w połączeniu cytoszkieletu ze szkieletem jądrowym [3, 30, 45, 46, 79, 94, 95] (ryc. 2) oraz odgrywają zasadniczą rolę w organizacji cytoplazmatycznej i polarności pewnych typów komórek [29]. Z drugiej strony, ciekawa jest koncepcja funkcjonowania blaszki jądrowej jako pewnego rodzaju zabezpieczenia zawartości jądra przed stresem mechanicznym działającym na poziomie komórkowym. Wywodzi się ona z obserwacji znacznej elastyczności, a jednocześnie ograniczonej ściśliwości sieci sztywnych filamentów poddanych działaniu przeciwstawnych naprężeń w jądrach oocytów *Xenopus* [10].

Reasumując, wielopostaciowość i zmienny rozkład tkankowy lamin sugerują, iż oprócz funkcji podstawowych, niezależnych od typu komórki, białka te spełniają specyficzne tkankowo role, których zaburzenia wskutek mutacji mogą być związane z określonymi schorzeniami [90].

### 3. LAMINOPATIE – W KIERUNKU ROZUMIENIA PATOFIZJOLOGII

#### 3.1. Wielorakie możliwe uwarunkowania wykształcenia podobnego fenotypu oraz zbieżności fenotypowe pomiędzy laminopatiami

Wyrazem nieodzownego udziału lamin w wielu fundamentalnych procesach komórkowych jest fakt, że defekty tych białek niezwykle często leżą u podstaw różnorodnych stanów chorobowych, określanых wspólnym mianem laminopatii [4, 31, 56]. Zależności tego rodzaju dla lamin typu B nie zostały dotychczas zidentyfikowane, a za prawdopodobną przyczynę tego zjawiska można uznać letalność w następstwie

mutacji na wczesnych etapach rozwoju [85]. Z kolei dla genu *Lmna* opisano ponad 230 mutacji ujawniających się przede wszystkim w postaci potencjalnie patogennych substytucji pojedynczych aminokwasów [74]. Poza tym spotykane mogą być delecje dotyczące dłuższych fragmentów łańcucha polipeptydowego, jak np. w progerii Hutchinsona-Gilforda [11, 16]. Dodatkowo dowiedziono, że fenotypy chorobowe charakteryzujące się znacznym podobieństwem mogą wykształcić się nie tylko w efekcie mutacji samego genu kodującego laminę A/C, ale także na skutek anomalii lub niedoboru innych czynników, zwłaszcza uczestniczących w prawidłowej obróbce potranslacyjnej laminy A [1, 2, 65]. Przykładowo, podłożem do powstania MAD, czyli dysplazji żuchwowo-obończykowej są zarówno homozygotyczne mutacje zmiany sensu genu *Lmna* (Arg527His, Ala529Val), prawdopodobnie skutkujące nadmierną akumulacją prelaminy A [5, 18, 22, 61], bądź też defekty istotnych funkcjonalnie sekwencji genu *Zmpste24*, kodującego metaloproteinazę cynkową, odpowiedzialną za proteolityczne przetwarzanie prelaminy A [1]. Równocześnie Agarwal i in. (2003) oraz Simha i in. (2003) nie zidentyfikowali żadnych zaburzeń w obrębie genów *Zmpste24* i *Lmna* u niektórych pacjentów z cechami fenotypowymi MAD, sugerując wpływ innych, niepoznanych dotąd loci na dojrzewanie produktów białkowych lub na interakcje typowe dla lamin A/C [1, 75]. Analogicznie, istnieją doniesienia dotyczące autosomalnej dominującej formy dystrofii mięśniowej Emery'ego-Dreifussa (EDMD) wskazujące, że członkowie rodzin z tą chorobą mogą mieć niezmieniony gen *Lmna*, a zatem w tym przypadku do wykształcenia nieprawidłowego fenotypu przyczynia się przynajmniej jeden inny gen [89]. Stąd też do grupy laminopatii, czyli patologii towarzyszących zaburzeniom białek laminowych [31], czy też raczej (w szerszym zakresie) do chorób otoczki jądrowej bądź nukleopatii [31, 38, 77] zalicza się schorzenia warunkowane mutacjami samych lamin oraz, z drugiej strony, te skutkujące często wykształceniem podobnego fenotypu, ale spowodowane defektami innych czynników, np. innych elementów architektury jądra, takich jak LAP2 $\alpha$ , LBR czy emeryna [38, 82, 88].

Oprócz możliwości tak różnorodnych uwarunkowań, typowym dla laminopatii zjawiskiem jest występowanie pewnych zbieżności między poszczególnymi zaburzeniami, które z tego względu niejednokrotnie postrzegane są raczej jako swego rodzaju spektrum kliniczne modyfikowane wpływem wielu czynników niż jako odrębne jednostki chorobowe [4, 23, 24, 55]. Zgodnie z tymi spostrzeżeniami Burke i Stewart (2002) podają informacje o sytuacji, w której wśród członków jednej rodziny na podstawie objawów zdiagnozowano trzy różne miopatie towarzyszące defektom genu *Lmna*, a mianowicie: autosomalną odmianę dystrofii Emery'ego-Dreifussa (EDMD), idiopatyczną kardiomiopatię rozstrzeniową (DCM) oraz obręczowo-kończynową dystrofię typu 1B (LGMD1B) [4]. Podobnie Garg i in. (2002) zidentyfikowali u dwóch rodzin z rodzinną lipodystrofią typu Dunningana (FPLD) dwie unikalne mutacje *Lmna* (skupiające się w domenach N-końcowej i centralnej lamin). Stwierdzili oni jednocześnie, że symptomy przypominające kardiomiopatię oraz łagodną dystrofię mięśniową pojawiły się prawdopodobnie w efekcie tych samych zaburzeń genetycznych co FPLD, a to z kolei stanowi odzwierciedlenie wykształcenia złożonego syndromu dystroficznego u zbadanych pacjentów [23].

Trudnościom związanym z ustaleniem przyczyn i mechanizmów laminopatii towarzyszą także niedogodności w przeprowadzaniu analiz spowodowane faktem, że większość tych chorób ma autosomalny dominujący charakter [31, 74], a zatem niezmieniony allel koduje prawidłowe białko, które może wystąpić jako produkt obok swojej zmutowanej formy [37]. Ostatecznie, mimo wielu kwestii kontrowersyjnych oraz pewnych cech fenotypowych pokrywających się między poszczególnymi zaburzeniami, na podstawie zidentyfikowanych specyficznych mutacji i unikalnych objawów wśród heterogennej grupy laminopatii wyróżnia się między innymi: dystrofię mięśniową Emery'ego-Dreifussa (EDMD), obręczowo-kończynową dystrofię typu 1B (LGMD1B), izolowaną, czyli idiopatyczną kardiomiopatię rozstrzeniową (DCM), chorobę Charcot-Marie-Tooth 2B1 (CMT2B1), rodzinną lipodystrofię typu Dunningana (FPLD), dysplazję żuchwowo-obończykową (MAD), progerię Hutchinsona-Gilforda (HGPS), pewne przypadki nietypowego syndromu Wernera oraz niedawno opisaną dermatopatię restrykcyjną (RD) [4, 7, 12, 16, 31, 56, 58, 61]. Oprócz anomalii związanych z mutacjami samych lamin, do szeregu laminopatii zaliczane mogą być również schorzenia, kształtowane defektami innych białek uczestniczących w oddziaływaniach z laminami, takie jak: postać EDMD towarzysząca mutacji emeryny (X-EDMD), dysplazja szkieletowa Greenberga (HEM), anomalia Pelger-Huët (PHA), syndrom Buschke-Ollendorff (BOS), melorheostoza, czy też osteopoikiloza [4, 31, 33, 35, 88]. Najczęściej spotykane zmiany w wymienionych zespołach chorobowych dotyczą: zaburzeń funkcjonowania mięśni poprzecznie prążkowanych zarówno szkieletowych, jak i mięśnia sercowego (EDMD, X-EDMD, LGMD1B, DCM), anomalii rozmieszczenia głównie tkanki kostnej (BOS, melorheostoza, osteopoikiloza), tkanki tłuszczowej i kostnej (FPLD, MAD), defektów przewodzenia nerwowego na skutek demielinacji włókien nerwowych ruchowych (CMT2B1), wadliwego rozwoju skóry (RD), tkanki chrzęstnej (HEM), nieprawidłowej budowy jąder neutrofilii (PHA), a także szczególnie interesującego zjawiska przypominającego przedwczesne starzenie się organizmu (HGPS, nietypowy syndrom Wernera) oraz przyspieszonej śmierci (HGSP, nietypowy syndrom Wernera, RD, HEM) [4, 24, 33, 35, 56, 58, 88].

### 3.2. Zmiany na poziomie komórkowym towarzyszące laminopatiom

Równocześnie obserwowane mogą być nieprawidłowości na poziomie komórkowym, wyrażające się głównie nietypowym kształtem jądra, wadami organizacji heterochromatyny oraz lokalizacji różnych komponentów otoczki jądrowej [4, 25, 62, 63, 86]. Z wykorzystaniem metody transfekcji cDNA do mioblastów dowiedziono, że określone defekty *Lmna* powodujące DCM czy EDMD przyczyniają się prawdopodobnie do tworzenia dużych nukleoplazmatycznych skupień zmutowanych białek, którym towarzyszą także natywne formy lamin, podlegające częściowemu przemieszczeniu z peryferii jądra oraz zwiększona utrata emeryny z otoczki jądrowej [62]. Również analizy immunofluorescencyjne prawidłowych komórek transfekowanych odpowiednimi zmutowanymi konstruktami oraz fibroblastów skórnych pochodzących od pacjentów z FPLD wykazały istnienie znaczących analogii między tymi typami komórek, przejawiających się w anomaliach morfologii jądra, rozmieszczenia składników wewnętrznej błony

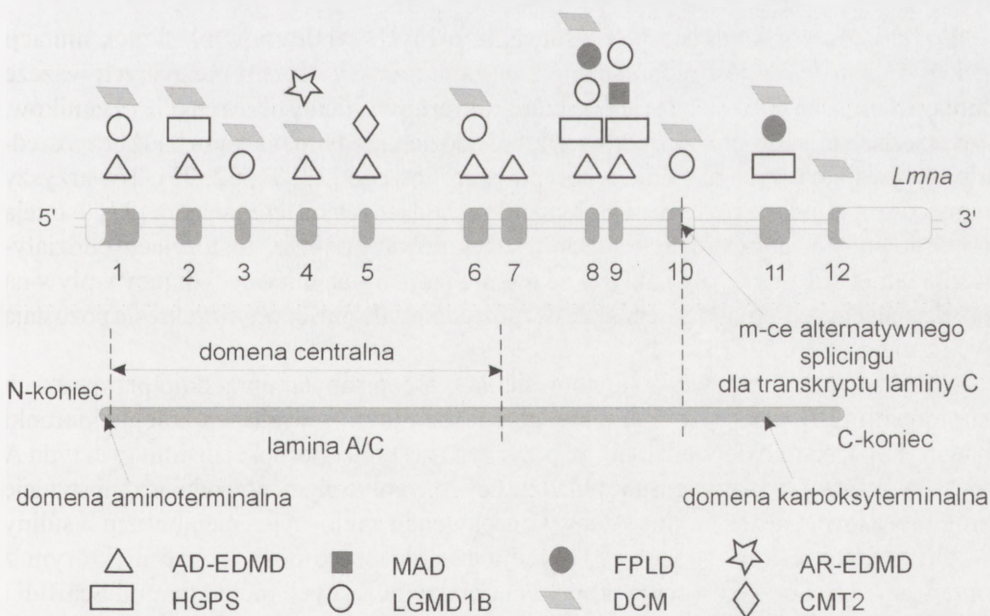
jądrowej i kompleksów porów jądrowych, a także w miejscowej dekondensacji chromatyny i w zaburzeniach organizacji lamin, a w szczególności nietypowych dla lamin typu A struktur, przypominających plaster miodu. Łącznie ze zwiększoną podatnością zdeformowanych jąder na uszkodzenia w warunkach stresowych, wyniki te jednoznacznie sugerują udział nieprawidłowych form laminy A w wykształceniu obserwowanych na poziomie komórkowym zmian, co w konsekwencji determinuje również właściwości tkanki [86]. Podobne wyniki odnośnie defektów kształtu jąder oraz wzrostu wrażliwości na szok cieplny dostrzeżono także w podgrupie fibroblastów pochodzących od pacjentów z HGPS. Jednakże, w trakcie tych badań prowadzonych na wczesnych etapach kultury komórkowej nie wykazano drastycznych zaburzeń w rozmieszczeniu chromatyny ani w lokalizacji lamin typu A, laminy B1 czy emeryny, a nawet wahań poziomów ekspresji wymienionych białek [63]. W przeciwieństwie do tego, Goldman i in. (2004) zwrócili uwagę na znaczące nieregularności w morfologii jąder fibroblastów z mutacją typową dla HGPS, związane nie tylko z powstawaniem uwypukleń otoczki jądrowej, ale również utratą peryferyjnej heterochromatyny skorelowaną z pogrubieniem blaszki jądrowej i skupianiem się porów jądrowych [25]. Poza tym obserwowano osłabione oddziaływania między laminami typu A i B oraz podniesiony poziom lamin typu A, a w szczególności zmutowanego białka (laminy A z delecją 50 aminokwasów), przy czym wszystkie te nieprawidłowości nasilały się bądź dopiero pojawiały wraz ze wzrostem liczby pasaży w kulturze komórkowej. W tej sytuacji zasugerowano, że na wykształcenie takich postępujących zmian fenotypowych wpływa przede wszystkim kumulacja wadliwej formy laminy, powodująca dysfunkcję jądra w szerokim zakresie [25]. W fibroblastach pochodzących od pacjentów z HGPS czy w komórkach tłuszczowych i mięśniowych z defektem występującym w FPLD nie stwierdzono natomiast przemieszczania się emeryny do siateczki śródplazmatycznej ani jej utraty z otoczki jądrowej, co miało miejsce w przypadku mioblastów z niektórymi mutacjami typowymi w EDMD [25, 37, 62, 63]. Mogłoby się zatem wydawać, że zaburzenia oddziaływań emeryny z laminami są przyczyną ostatniej z wymienionych chorób, tym bardziej, że istnieje także jej odmiana związana z mutacją samej emeryny [4, 39, 52]. Różnice podkreślone w toku późniejszych badań autosomalnej dominującej postaci EDMD, dotyczące lokalizacji znacznej puli LBR w siateczce śródplazmatycznej, jak również, zwłaszcza w komórkach mięśniowych, organizacji aktywnej polimerazy II RNA mogą odzwierciedlać odmiennosc analizowanych substytucji genowych w stosunku do opisanych uprzednio [62, 68], niemniej jednak wszystkie te mutacje leżą u podstaw tego samego schorzenia. Reasumując, zmiany na poziomie komórkowym towarzyszące laminopatii, chociaż często ujawniają wiele cech wspólnych, mogą równocześnie dostarczyć wskazówek cennych dla rozumienia podłoża poszczególnych syndromów tej grupy, związanych z określonymi mutacjami.

### 3.3. Hipotezy przybliżające mechanizmy wykształcenia laminopatii

Kwestią kontrowersyjną pozostaje wciąż zjawisko tak rozległej specyfiki tkankowej i różnorodności chorób, będących przecież wynikiem defektów w obrębie jednego genu *Lmna* [4, 39, 56, 89, 90]. Zaistniała sytuacja doprowadziła do wyłonienia kilku hipotez



badawczych wyjaśniających ten fenomen [38, 52]. Podstawą ich stały się doniesienia sugerujące, że mutacje lamin i zaburzenia tkankowo-specyficznych interakcji tych białek z innymi czynnikami mogą przyczyniać się do wykształcenia laminopatii na skutek: działania stresu mechanicznego na otoczkę jądrową o naruszonej integralności, wadliwego funkcjonowania i struktury siateczki śródplazmatycznej, zakłóceń replikacji i cyklu komórkowego czy nieprawidłowej ekspresji genów istotnych dla właściwego różnicowania i utrzymania aktywności komórek w tkance [3, 8, 24, 38, 39, 52, 68, 77, 89, 90]. W kontekście obserwowanych na poziomie komórkowym zmian organizacji peryferyjnej heterochromatyny [25, 86] szczególnie atrakcyjna wydaje się ostatnia z powyższych hipotez, tym bardziej, że czynniki oddziałujące z laminami typu A, takie jak MOK2 czy BAF, uczestniczą w represji transkrypcji [15, 52]. Dalszym potwierdzeniem może być porównanie profili ekspresji genów fibroblastów normalnych i pobranych od pacjentów z HGPS, wskazujące na wyraźne różnice, dotyczące zwłaszcza czynników transkrypcyjnych niezbędnych dla rozwoju i różnicowania komórek mezenchymatycznych, z których wywodzą się tkanki dotknięte zaburzeniami w HGPS [9]. Jednakże, zaproponowane mechanizmy powstawania laminopatii nie zawsze wykluczają się wzajemnie. Przykładowo, Lammerding i in. (2004) zaproponowali uzupełnianie się hipotez strukturalnej i ekspresji genów na podstawie obserwacji, że pod wpływem stresu mechanicznego aktywność czynnika transkrypcyjnego o potencjalnej funkcji antyapoptotycznej, czyli NF- $\kappa$ B, jest



RYCINA 3. Schematyczne odwzorowanie rozkładu mutacji związanych z wybranymi lamiopatiami wzdłuż genu *Lmna*. Zgodnie z [49, 60], zmodyfikowany. Cyframi oznaczono kolejne eksony (1–12), jaśniejsze obszary to sekwencje niepodlegające translacji. W eksonie 10 widoczne miejsce alternatywnego splicingu. Równoległe przedstawiono rozkład domen w cząsteczce białka, zgodnie z [4], zmodyfikowany. AD – mutacja autosomalna dominująca, AR – mutacja recesywna; pozostałe skróty według wykazu skrótów

znacznie osłabiona w fibroblastach mysich pozbawionych genu *Lmna* [43]. Z drugiej strony odrębne hipotetyczne mechanizmy mają prawdopodobnie zmienny udział w wykształceniu poszczególnych fenotypów chorobowych. Chociaż na gruncie stresu mechanicznego stosunkowo łatwo zinterpretować patologie tkanki mięśniowej, jest to już znacznie trudniejsze w przypadku innych tkanek [56, 89]. Pewnych sugestii może dostarczyć również analiza lokalizacji określonych mutacji poprzez wytypowanie obszarów w domenach trójwymiarowej struktury białka, w których defekty te przyczyniają się do zaburzeń określonych funkcji czy oddziaływań [41, 74] (ryc. 3). Zgodnie z tym substytucje towarzyszące patologiom tkanki mięśniowej sprzyjają destabilizacji domeny analogicznej do immunoglobulin, podczas gdy zmiany ładunku w miejscach predysponowanych do istotnych interakcji towarzyszą FPLD [13, 41].

Jednocześnie, ustalenie podłoża i mechanizmów wykształcenia laminopatii dodatkowo utrudnia fakt, że unikalny skład poszczególnych podtypów lamin związany ze zmienną stabilnością kształtujących się między nimi oddziaływań może być czynnikiem modyfikującym właściwości blaszki jądrowej w komórkach o różnorodnym pochodzeniu tkankowym i na różnych etapach różnicowania [72].

#### 4. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Dążenie do poznania istoty powstawania różnych syndromów na skutek mutacji jednego genu *Lmna* jest nieodłącznie związane z odkrywaniem nieznanych jeszcze funkcji lamin, a także z powiększaniem się grupy zidentyfikowanych czynników, zwłaszcza elementów otoczki jądrowej, które oddziałują z tymi białkami bądź bezpośrednio wpływają na wykształcenie fenotypu chorobowego [27, 31, 52, 73]. Towarzyszy temu coraz pełniejsze rozumienie interakcji zachodzących na terenie jądra [27]. Istnieją nowe dowody na potwierdzenie sugestii, że regulowane poprzez fosforylację oddziaływanie lamin A/C, emeryny i aktyny na terenie jądra mogą mieć decydujący wpływ na przekształcenia chromatyny, jednakże bezpośrednie zależności w tym zakresie pozostają wciąż niejasne [6, 52, 73].

Z drugiej strony pojawiają się doniesienia o nieopisanych uprzednio przypadkach laminopatii [26], a cel – zrozumienie ich patofizjologii – wyznacza kolejne kierunki badań [52]. Ostatnio dowiedziono, że przyczyną zespołu oporności insulinowej typu A może być mutacja zmiany sensu w układzie heterozygotycznym, powodująca substytucję aminokwasową G602S laminy A, a w konsekwencji zakłócająca metabolizm insuliny w bliżej nieokreślony sposób [91]. Jednocześnie prace poświęcone niektórym z omawianych schorzeń owocują propozycjami nowoczesnych metod terapii. Scaffidi i Misteli (2005) wykazali, że z zastosowaniem zmodyfikowanych oligonukleotydów możliwe jest przywrócenie prawidłowego składu pre-mRNA oraz właściwej morfologii i funkcji jąder fibroblastów z mutacją typową dla HGPS [71]. Następnie, Fong i in. (2006) stwierdzili, że myszy produkujące tylko laminę C (*Lmna*<sup>LCO/LCO</sup>) nie chorują, a w komórkach o nieprawidłowym przetwarzaniu prelamin A redukcja jej poziomu przy pomocy specyficznych oligonukleotydów skutkuje spadkiem częstotliwości

zdeformowanych jąder. Metoda ta mogłaby zatem stanowić podstawę terapii wszystkich zaburzeń laminy A, jednak uprzednio konieczne są badania potwierdzające bezpieczeństwo jej stosowania [19].

## LITERATURA

- [1] AGARWAL AK, FRYNS J-P, AUCHUS RJ, GARG A. Zinc metalloproteinase, *ZMPSTE24*, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 1995–2001.
- [2] BERGO MO, GAVINO B, ROSS J, SCHMIDT WK, HONG C, KENDALL LV, MOHR A, META M, GENANT H, JIANG Y, WISNER ER, van BRUGGEN N, CARANO RAD, MICHAELIS S, GRIFFEY SM, YOUNG SG. *Zmpste24* deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 13049–13054.
- [3] BROERS JLV, PEETERS EAG, KUIJPERS HJH, ENDERT J, BOUTEN CVC, OOMENS CWJ, BAAIJENS FPT, RAMAEKERS FCS. Decreased mechanical stiffness in LMNA<sup>-/-</sup> cells is caused by defective nucleocytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 2567–2580.
- [4] BURKE B, STEWART CL. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Mol Cell Biol* 2002; **3**: 575–585.
- [5] CAPANNI C, MATTIOLI E, COLUMBARO M, LUCARELLI E, PARNAIK VK, NOVELLI G, WEHNERT M, CENNI V, MARALDI NM, SQUARZONI S, LATTANZI G. Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 1489–1502.
- [6] CENNI V, SABATELLI P, MATTIOLI E, MARMIROLI S, CAPANNI C, OGNIBENE A, SQUARZONI S, MARALDI M, BONNE G, COLUMBARO M, MERLINI L, LATTANZI G. Lamin A N-terminal phosphorylation is associated with myoblast activation: impairment in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Med Genet* 2005; **42**: 214–220.
- [7] CHEN L, LEE L, KUDLOW BA, DOS SANTOS HG, SLETVOLD O, SHAFEGHATI Y, BOTHA EG, GARG A, HANSON NB, MARTIN GM, MIAN IS, KENNEDY BK, OSHIMA J. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 2003; **362**: 440–445.
- [8] COHEN M, LEE KK, WILSON KL, GRUENBAUM Y. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 41–47.
- [9] CSOKA AB, ENGLISH SB, SIMKEVICH CP, GINZINGER DG, BUTTE AJ, SCHATTEN GP, ROTHMAN FG, SEDIVY JM. Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging Cell* 2004; **3**: 235–243.
- [10] DAHL KN, KAHN SM, WILSON KL, DISCHER DE. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci* 2004; **117**: 4779–4786.
- [11] DE SANDRE-GIOVANNOLI A, BERNARD R, CAU P, NAVARRO C, AMIEL J, BOCCACCIO I, LYONNET S, STEWART CL, MUNNICH A, LE MERRER M, LÉVY N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003; **300**: 2055.
- [12] DE SANDRE-GIOVANNOLI A, CHAOUCH M, KOZLOV S, VALLAT J-M, TAZIR M, KASSOURI N, SZEPE-TOWSKI P, HAMMADOUCHE T, VANDENBERGHE A, STEWART CL, GRID D, LÉVY N. Homozygous defects in *LMNA*, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 2002; **70**: 726–736.
- [13] DHE-PAGANON S, WERNER ED, CHI Y-I, SHOELSON SE. Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem* 2002; **277**: 17381–17384.
- [14] DREGER M, BENGTSOON L, SCHÖNEBERG T, OTTO H, HUCHO F. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 11943–11948.
- [15] DREUILLET C, TILLIT J, KRESS M, ERNOULT-LANGE M. *In vivo* and *in vitro* interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 4634–4642.
- [16] ERIKSSON M, BROWN WT, GORDON LB, GLYNN MW, SINGER J, SCOTT L, ERDOS MR, ROBBINS CM, MOSES TY, BERGLUND P, DUTRA A, PAK E, DURKIN S, CSOKA AB, BOEHNKE M, GLOVER TW, COLLINS FS. Recurrent *de novo* point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; **423**: 293–298.

- [17] FAVREAU C, HIGUET D, COURVALIN J-C, BUENDIA B. Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits *in vitro* differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 1481–1492.
- [18] FILESI I, GULLOTTA F, LATTANZI G, D'APICE MR, CAPANNI C, NARDONE AM, COLUMBARO M, SCARANO G, MATTIOLI E, SABATELLI P, MARALDI NM, BIOCCA S, NOVELLI G. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics* 2005; **23**: 150–158.
- [19] FOISNER R. Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J Cell Sci* 2001; **114**: 3791–3792.
- [20] FONG LG, NG JK, LAMMERDING J, VICKERS TA, META M, COTÉ N, GAVINO B, QIAO X, CHANG SY, YOUNG SR, YANG SH, STEWART CL, LEE RT, BENNETT CF, BERGO MO, YOUNG SG. Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest* 2006; **116**: 743–752.
- [21] FURUKAWA K, SUGIYAMA S, OSOUDA S, GOTO H, INAGAKI M, HORIGOME T, OMATA S, MCCONNELL M, FISHER PA, NISHIDA Y. Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J Cell Sci* 2003; **116**: 3811–3823.
- [22] GARG A, COGULU O, OZKINAY F, ONAY H, AGARWAL AK. A novel homozygous Ala529Val *LMNA* mutation in Turkish patients with mandibuloacral dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 5259–5264.
- [23] GARG AM, SPECKMAN RA, BOWCOCK AM. Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am J Med* 2002; **112**: 549–555.
- [24] GOLDMAN RD, GRUENBAUM Y, MOIR RD, SHUMAKER DK, SPANN TP. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & Dev* 2002; **16**: 533–547.
- [25] GOLDMAN RD, SHUMAKER DK, ERDOS MR, ERIKSSON M, GOLDMAN AE, GORDON LB, GRUENBAUM Y, KHUON S, MENDEZ M, VARGA R, COLLINS FS. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 8963–8968.
- [26] GOIZET C, BEN YAOU R, DEMAY L, RICHARD P, BOUILLOT S, ROUANET M, HERMOSILLA E, LE MASSON G, LAGUENY A, BONNE G, FERRER X. A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia. *J Med Genet* 2004; **41**: e29.
- [27] GRUENBAUM Y, MARGALIT A, GOLDMAN RD, SHUMAKER DK, WILSON K. The nuclear lamina: comes of age. *Mol Cell Biol* 2005; **6**: 21–31.
- [28] GRUENBAUM Y, WILSON KL, HAREL A, GOLDBERG M, COHEN M. Review: nuclear lamins – structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* 2000; **129**: 313–323.
- [29] GUILLEMIN K, WILLIAMS T, KRASNOW MA. A nuclear lamin is required for cytoplasmic organization and egg polarity in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 848–851.
- [30] HAQUE F, LLOYD DJ, SMALLWOOD DT, DENT CL, SHANAHAN CM, FRY AM, TREMBATH RC, SHACKLETON S. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 3738–3751.
- [31] HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I. Laminopatie – wspólny mianownik wielu stanów chorobowych (nowy rozdział neuromiologii i nie tylko). *Neurol i Neurochir Pol* 2004; **38**: 1–2.
- [32] HAWRYLUK-GARA LA, SHIBUYA EK, WOZNIAK RW. Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93-containing complex. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 2382–2394.
- [33] HELLEMANS J, PREOBRAZHENSKA O, WILLAERT A, DEBEER P, VERDONK PCM, COSTA T, JANSSENS K, MENTEN B, VAN ROY N, VERMEULEN SJT, SAVARIRAYAN R, VAN HUL W, VAN-HOENACKER F, HUYLEBROECK D, DE PAEPE A, NAEYAERT J-M, VANDESOMPELE J, SPELMAN F, VERSCHUEREN K, COUCKE PJ, MORTIER GR. Loss-of-function mutations in *LEM3* result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet* 2004; **36**: 1213–1218.
- [34] HOFEMEISTER H, KUHN C, FRANKE WW, WEBER K, STICK R. Conservation of the gene structure and membrane-targeting signals of germ cell-specific lamin LIII in amphibians and fish. *Eur J Cell Biol* 2002; **81**: 51–60.
- [35] HOFFMANN K, DREGER CK, OLINS AL, OLINS DE, SHULTZ LD, LUCKE B, KARL H, KAPS R, MÜLLER D, VAYÁ A, AZNAR J, WARE RE, SOTELO CRUZ N, LINDNER TH, HERRMANN H, REIS A, SPERLING K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). *Nat Genet* 2002; **31**: 410–414.
- [36] HOLASKA JM, WILSON KL, MANSHARAMANI M. The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 357–364.

- [37] HOLT I, CLEMENTS L, MANILAL S, BROWN SC, MORRIS GE. The R482Q lamin A/C mutation that causes lipodystrophy does not prevent nuclear targeting of lamin A in adipocytes or its interaction with emerin. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 204–208.
- [38] HUTCHISON CJ. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Mol Cell Biol* 2002; **3**: 848–858.
- [39] HUTCHISON CJ, ALVAREZ-REYES M, VAUGHAN OA. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci* 2001; **114**: 9–19.
- [40] JOHNSON BR, NITTA RT, FROCK RL, MOUNKES L, BARBIE DA, STEWART CL, HARLOW E, KENNEDY BK. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9677–9682.
- [41] KRIMM I, ÖSTLUND C, GILQUIN B, COUPRIE J, HOSSENLOPP P, MORNON J-P, BONNE G, COURVALIN J-C, WORMAN HJ, ZINN-JUSTIN S. The Ig-like structure of the C-terminal domain of Lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* 2002; **10**: 811–823.
- [42] KUMARAN RI, MURALIKRISHNA B, PARNAIK VK. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J Cell Biol* 2002; **159**: 783–793.
- [43] LAMMERDING J, SCHULZE PC, TAKAHASHI T, KOZLOV S, SULLIVAN T, KAMM RD, STEWART CL, LEE RT. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* 2004; **113**: 370–378.
- [44] LEE KK, HARAGUCHI T, LEE RS, KOUJIN T, HIRAOKA Y, WILSON KL. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4567–4573.
- [45] LEE KK, STARR D, COHEN M, LIU J, HAN M, WILSON KL, GRUENBAUM Y. Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *C. elegans*. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 892–901.
- [46] LIBOTTE T, ZAIM H, ABRAHAM S, PADMAKUMAR VC, SCHNEIDER M, LU W, MUNCK M, HUTCHISON C, WEHNERT M, FAHRENKROG B, SAUDER U, AEBI U, NOEGEL AA, KARAKESI-SOGLIOU I. Lamin A/C-dependent localization of nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 3411–3424.
- [47] LLOYD DJ, TREMBATH RC, SHACKLETON S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 769–777.
- [48] LOPEZ-SOLER RI, MOIR RD, SPANN TP, STICK R, GOLDMAN RD. A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 2001; **154**: 61–70.
- [49] MAIDMENT SL, ELLIS JA. Muscular dystrophies, dilated cardiomyopathy, lipodystrophy and neuropathy: the nuclear connection. *Expert Rev Mol Med* 2002; **4**: 1–21.
- [50] MANI SS, RAJAGOPAL R, GARFINKEL AB, FAN X, WOLFNER MF. A hydrophilic lamin-binding domain from the *Drosophila* YA protein can target proteins to the nuclear envelope. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2067–2072.
- [51] MANSHARAMANI M, WILSON KL. Nuclear membrane protein MAN1: Direct binding to emerin *in vitro* and two modes of binding to BAF. *J Biol Chem* 2005; **280**: 13863–13870.
- [52] MARALDI NM, SQUARZONI S, SABATELLI P, CAPANNI C, MATTIOLI E, OGNIBENE A, LAT-TANZI G. Laminopathies: involvement of structural nuclear proteins in the pathogenesis of an increasing number of human diseases. *J Cell Physiol* 2005; **203**: 319–327.
- [53] MARKIEWICZ E, DECHAT T, FOISNER R, QUINLAN RA, HUTCHISON CJ. Lamin A/C binding protein LAP2 $\alpha$  is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 4401–4413.
- [54] MOIR RD, SPANN TP, LOPEZ-SOLER RI, YOON M, GOLDMAN AE, KHUON S, GOLDMAN RD. Review: the dynamics of the nuclear lamins during cell cycle – relationship between structure and function. *J Struct Biol* 2000; **129**: 324–334.
- [55] MOUNKES LC, KOZLOV S, HERNANDEZ L, SULLIVAN T, STEWART CL. A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* 2003; **423**: 298–301.
- [56] MOUNKES LC, STEWART CL. Aging and nuclear organization: lamins and progeria. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16**: 322–327.
- [57] MURALIKRISHNA B, THANUMALAYAN S, JAGATHEESAN G, RANGARAJ N, KARANDE AA, PARNAIK VK. Immunolocalization of detergent-susceptible nucleoplasmic lamin A/C foci by a novel monoclonal antibody. *J Cell Biochem* 2004; **91**: 730–739.
- [58] NAVARRO CL, DE SANDRE-GIOVANNOLI A, BERNARD R, BOCCACCIO I, BOYER A, GENEVIÈVE D, HADJ-RABIA S, GAUDY-MARQUESTE C, SMITT HS, VABRES P, FAIVRE L, VERLOES A, VAN ESSEN T, FLORI E, HENNEKAM R, BEEMER FA, LAURENT N, LE MERRER M, CAU P, LÉVY N. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 2493–2503.

- [59] NILI E, COJOCARU GS, KALMA Y, GINSBERG D, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, BERGER R, SHAKLAI S, AMARIGLION, BROK-SIMONI F, SIMON AJ, RECHAVI G. Nuclear membrane protein LAP2 $\beta$  mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci* 2001; **114**: 3297–3307.
- [60] NOVELLI G, D'APICE MR. The strange case of the 'lumper' lamin A/C gene and human premature ageing. *Trends Mol Med* 2003; **9**: 370–375.
- [61] NOVELLI G, MUCHIR A, SANGIUOLO F, HELBLING-LECLERC A, D'APICE MR, MASSART C, CAPON F, SBRACCIA P, FEDERICI M, LAURO R, TUDISCO C, PALLOTTA R, SCARANO G, DAL-LAPICCOLA B, MERLINI L, BONNE G. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in *LMNA*-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 426–431.
- [62] ÖSTLUND C, BONNE G, SCHWARTZ K, WORMAN J. Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4435–4445.
- [63] PARADISI M, McCLINTOCK D, BOGUSLAVSKY RL, PEDICELLI C, WORMAN HJ, DJABALI K. Dermal fibroblasts in Hutchinson-Gilford progeria syndrome with the lamin A G608G mutation have dysmorphic nuclei and are hypersensitive to heat stress. *BMC Cell Biol* 2005; **6**: 27.
- [64] PARNAIK VK, MANJU K. Laminopathies: Multiple disorders arising from defects in nuclear architecture. *J Biosci* 2006; **31**: 405–421.
- [65] PENDÁS AM, ZHOU Z, CADIÑANOS J, FREIJE JMP, WANG J, HULTENBY K, ASTUDILLO A, WERNERSON A, RODRÍGUEZ F, TRYGGVASON K, LÓPEZ-OTÍN C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 2002; **31**: 94–99.
- [66] PRÜFERT K, VOGEL A, KROHNE G. The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. *J Cell Sci* 2004; **117**: 6105–6116.
- [67] RAHARJO WH, ENARSON P, SULLIVAN T, STEWART CL, BURKE B. Nuclear envelope defects associated with *LMNA* mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4447–4457.
- [68] REICHHART B, KLAFKE R, DREGER C, KRÜGER E, MOTSCH I, EWALD A, SCHÄFER J, REICHMANN H, MÜLLER CR, DABAUVALLE M-C. Expression and localization of nuclear proteins in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with *LMNA* R377H mutation. *BMC Cell Biol* 2004; **5**: 12.
- [69] RZEPECKI R. The nuclear lamins and the nuclear envelope. *Cell Mol Biol Lett* 2002; **7**: 1019–1035.
- [70] SAKAKI M, KOIKE H, TAKAHASHI N, SASAGAWA N, TOMIOKA S, ARAHATA K, ISHIURA S. Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem* 2001; **129**: 321–327.
- [71] SCAFFIDI P, MISTELI T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nat Med* 2005; **11**: 440–445.
- [72] SCHIRMER EC, GERACE L. The stability of the nuclear lamina polymer changes with the composition of lamin subtypes according to their individual binding strengths. *J Biol Chem* 2004; **279**: 42811–42817.
- [73] SHUMAKER DK, KUCZMARSKI ER, GOLDMAN RD. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 358–366.
- [74] SHUMAKER DK, LOPEZ-SOLER RI, ADAM SA, HERRMANN H, MOIR RD, SPANN TP, GOLDMAN RD. Functions and dysfunctions of the nuclear lamin Ig-fold domain innuclear assembly, growth, and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 15494–15499.
- [75] SIMHA V, AGARWAL AK, ORAL EA, FRYNS J-P, GARG A. Genetic and phenotypic heterogeneity in patients with mandibuloacral dysplasia-associated lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 2821–2824.
- [76] SMITH TA, STRELKOV SV, BURKHARD P, AEBI U, PARRY DAD. Sequence comparisons of intermediate filament chains: evidence of a unique functional/structural role for coiled-coil segment 1A and linker L1. *J Struct Biol* 2002; **137**: 128–145.
- [77] SOMECH R, SHAKLAI S, AMARIGLION, RECHAVI G, SIMON AJ. Nuclear envelopopathies – raising the nuclear veil. *Pediatr Res* 2005; **57**: 8R–15R.
- [78] SPANN TP, GOLDMAN AE, WANG C, HUANG S, GOLDMAN RD. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* 2002; **156**: 603–608.
- [79] STARR DA, HAN M. Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* 2002; **298**: 406–409.

- [80] STIERLÉ V, COUPRIE J, ÖSTLUND C, KRIMM I, ZINN-JUSTIN S, HOSSENLOPP P, WORMAN HJ, COURVALIN J-C, DUBAND-GOULET I. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 2003; **42**: 4819–4828.
- [81] STUURMAN N, HEINS S, AEBI U. Nuclear lamins: their structure, assembly and interactions. *J Struct Biol* 1998; **122**: 42–66.
- [82] TAYLOR MRG, SLAVOV D, GAJEWSKI A, VLCEK S, KU L, FAIN PR, CARNIEL E, DI LENARDA A, SINAGRA G, BOUCEK MM, CAVANAUGH J, GRAW SL, RUEGG P, FEIGER J, ZHU X, FERGUSON DA, BRISTOW MR, GOTZMANN J, FOISNER R, MESTRONI L. Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2005; **26**: 566–574.
- [83] VAUGHAN OA, ALVAREZ-REYES M, BRIDGER JM, BROERS JLV, RAMAEKERS FCS, WEHNERT M, MORRIS GE, WHITFIELD WGF, HUTCHISON CJ. Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci* 2001; **114**: 2577–2590.
- [84] VAUGHAN OA, WHITFIELD WGF, HUTCHISON CJ. Functions of the nuclear lamins. *Protoplasma* 2000; **211**: 1–7.
- [85] VERGNES L, PÉTERFY M, BERGO MO, YOUNG SG, REUE K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 10428–10433.
- [86] VIGOUROUX C, AUCLAIR M, DUBOSCLARD E, POUCHELET M, CAPEAU J, COURVALIN J-C, BUENDIA B. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4459–4468.
- [87] WARREN DT, ZHANG Q, WEISSBERG PL, SHANAHAN CM. Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med* 2005; **7**: 1–15.
- [88] WATERHAM HR, KOSTER J, MOOYER P, VAN NOORT G, KELLEY RI, WILCOX WR, WANDERS RJA, HENNEKAM RCM, O OSTERWIJK JC. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta^{14}$ -reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet* 2003; **72**: 1013–1017.
- [89] WILSON KL. The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 125–129.
- [90] WILSON KL, ZASTROW MS. Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell* 2001; **104**: 647–650.
- [91] YOUNG J, MORBOIS-TRABUT L, COUZINET B, LASCOLS O, DION E, BÉRÉZIAT V, FČVE B, RICHARD I, CAPEAU J, CHANSON P, VIGOUROUX C. Type A insulin resistance syndrome revealing a novel lamin A mutation. *Diabetes* 2005; **54**: 1873–1878.
- [92] YU J, WOLFNER MF. The *Drosophila* nuclear lamina protein YA binds to DNA and histone H2B with four domains. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 558–569.
- [93] ZASTROW MS, VLCEK S, WILSON KL. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci* 2004; **117**: 979–987.
- [94] ZHANG Q, RAGNAUTH CD, SKEPPER JN, WORTH NF, WARREN DT, ROBERTS RG, WEISSBERG PL, ELLIS JA, SHANAHAN CM. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci* 2005; **118**: 673–687.
- [95] ZHANG Q, SKEPPER JN, YANG F, DAVIES JD, HEGYI L, ROBERTS RG, WEISSBERG PL, ELLIS JA, SHANAHAN CM. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4485–4498.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 28.06. 2006 r.

Przyjęto: 30.10. 2006 r.

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

e-mail: [annalitwiniec@gazeta.pl](mailto:annalitwiniec@gazeta.pl)





## KONTROLA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ PRZEZ NATURALNE (CD4+CD25+) KOMÓRKI REGULATOROWE

THE IMMUNE RESPONSE CONTROL  
BY NATURAL (CD4+CD25+) REGULATORY T CELLS

Magdalena CHORAŻY-MASSALSKA, Ewa KONTNY,  
Włodzimierz MAŚLIŃSKI

Zakład Patofizjologii i Immunologii Instytutu Reumatologii im. Eleonory Reicher  
w Warszawie

*Streszczenie:* Odkrycie komórek regulatorowych CD4+CD25+ dało początek wielu badaniom, dzięki którym dysponujemy znaczną, choć nadal niekompletną wiedzą na temat ich funkcji i mechanizmów działania. Regulatorowe limfocyty T (Treg) powstają głównie w grasicy, ale różnicują się także na obwodzie i w wyniku bezpośrednich interakcji międzykomórkowych hamują *in vitro* proliferację innych komórek (CD4, CD8, limfocytów B, NK). Komórki Treg kontrolują prawidłowy przebieg odpowiedzi immunologicznej. Ich niedobór lub upośledzenie czynnościowe może stanowić przyczynę rozwoju zjawisk autoimmunizacyjnych. Z drugiej strony nadczynność komórek Treg prowadzi do nadmiernego wyciszenia odpowiedzi immunologicznej, co w określonych warunkach, np. rozwoju nowotworu, może być niekorzystne dla gospodarza. Możliwość manipulacji liczbą komórek Treg niesie ze sobą duży potencjał terapeutyczny. Należy jednak pamiętać, że nawet delikatna dysregulacja limfocytów Treg może prowadzić do kolejnych immunopatologii.

*Słowa kluczowe:* komórki regulatorowe, cytokiny, hormony, immunopatogeneza.

*Summary:* Many studies that took place after discovery of regulatory T (Treg) cells have widened our, still incomplete, knowledge about that specialized cell population. Treg cells differentiate mainly in the thymus, but this process occurs also in the periphery. They suppress proliferation of other cells (CD4, CD8, B lymphocytes, NK) in direct, cell to cell, interactions *in vitro* and therefore are main controllers of the proper immune response. Deficiency as well as functional dysregulation of this population may be responsible for development of autoimmune events. On the other hand, overexpression may result in silencing the immune response that in certain conditions, like in cancer patients, may be life threatening for the host. Possible manipulation of Treg cells number may represent a promising therapeutic approach to many pathologies. However one should be aware that even delicate imbalance in Treg lymphocytes functions can lead to further immunopathologies.

*Key words:* regulatory T cells, cytokines, hormones, immunopathogenesis.

## FIZJOLOGICZNA ROLA KOMÓREK REGULATOROWYCH (Treg)

Komórki regulatorowe CD4+CD25+ (Treg) stanowią małą populację (5–10%) obwodowych limfocytów T CD4+, odpowiedzialną za utrzymanie obwodowej tolerancji immunologicznej. Różnicują się one przede wszystkim w grasicy, ale w pewnych warunkach powstają także na obwodzie [51, 95]. Początkowo uważano, że są to komórki anergiczne. Okazało się jednak, że limfocyty Treg proliferują *in vivo* oraz, przy zachowaniu odpowiednich warunków hodowli, także *in vitro*. Identyfikacja i izolacja komórek Treg nastęrcza wiele trudności. Do niedawna subpopulację tych komórek definiowano na podstawie obecności czynnika transkrypcyjnego Foxp3 i ekspresji wielu cząsteczek powierzchniowych (głównie CD4 i CD25), występujących także na innych limfocytach T [21, 51]. Ostatnie doniesienia wskazują, że specyficzną cechą komórek Treg jest obecność czynnika transkrypcyjnego Foxp3 oraz brak cząsteczki CD127, która jest receptorem dla interleukiny 7 (IL-7R) [55, 76]. Naturalne komórki regulatorowe (nTreg) odpowiadają na antygeny własne, a ich główną funkcją jest zapobieganie odpowiedzi autoimmunizacyjnej. Tym niemniej, coraz więcej danych wskazuje, że mogą one odpowiadać także na antygeny mikroorganizmów i dzięki temu regulować przebieg odpowiedzi przeciwniekcyjnej. Oprócz tego, limfocyty Treg uczestniczą w utrzymaniu naturalnej tolerancji podczas ciąży. Różnicowanie się limfocytów w komórki Treg i ich oddziaływanie z innymi komórkami układu odpornościowego są niezwykle złożone. Dzięki temu aktywność komórek Treg jest precyzyjnie regulowana (dostrajana) na różnych etapach odpowiedzi immunologicznej i pozwala na jej prawidłowy przebieg. Obecnie, gdy fakt istnienia limfocytów regulatorowych ponownie uzyskał akceptację immunologów, uważa się, że zaburzenia ilościowe i czynnościowe tej subpopulacji przyczyniają się do rozwoju różnych chorób (np. nowotworowych, autoimmunizacyjnych). Z drugiej strony, pełniejsze zrozumienie biologii tych komórek stwarza nowe możliwości terapeutyczne. Na obecnym etapie badań, podstawowym zagadnieniem jest określenie, w jakich sytuacjach patologicznych wzmocnienie lub osłabienie funkcji supresorowych komórek Treg może być korzystne dla organizmu [21, 50, 51, 73, 95].

### Kontrola odpowiedzi immunologicznej

Komórki regulatorowe (CD4+CD25+) hamują odpowiedź nie tylko na antygeny (Ag) własne (autoAg), ale również na Ag egzogenne. Intrygujące jest zatem pytanie, w jaki sposób z jednej strony utrzymywana jest supresja patologicznej odpowiedzi zagrażającej organizmowi (np. autoimmunizacyjnej lub nadmiernej przeciwbakteryjnej), a z drugiej strony jest „przyzwolenie” na obronną odpowiedź skierowaną przeciw organizmom patogennym atakującym organizm. Szereg obserwacji wskazuje, że decydujące znaczenie ma aktualna, zmieniająca się w czasie odpowiedzi immunologicznej, aktywność supresorowa komórek Treg. Nasilenie tej aktywności zależy od:

(i) poziomu ekspresji cząsteczek przekazujących sygnał aktywacyjny limfocytom Treg,

- (ii) dostępności ligandów inicjujących przekazanie sygnału przez te cząsteczki,
- (iii) wpływu cytokin oraz
- (iv) poziomu ekspresji receptorów i ligandów inicjujących apoptozę.

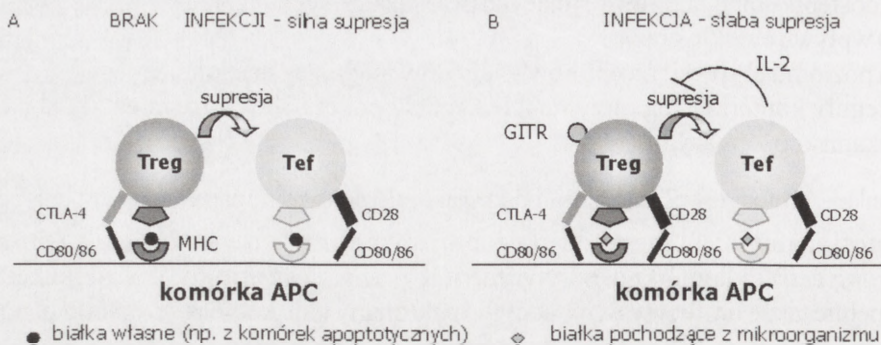
Z reguły komórki Treg otrzymują te sygnały podczas bezpośredniego kontaktu z komórkami kooperującymi.

a) Funkcje limfocytów Treg zależą od kontaktu z komórkami prezentującymi antygen

Profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen (APC – ang. *antigen presenting cell*) są komórki dendrytyczne (DC – ang. *dendritic cell*), choć funkcje te mogą pełnić także limfocyty B, monocyty, makrofagi i inne komórki. Komórki dendrytyczne w zależności od stopnia dojrzałości mogą, poprzez wpływ na czynność komórek Treg, indukować tolerancję lub odpowiedź immunologiczną. Zależy to m.in. od ekspresji cząsteczek z rodziny B7 (CD80/86) na komórkach dendrytycznych [51]. Charakterystyczną cechą niedojrzałych DC jest obecność cząsteczki CD80. W miarę dojrzewania tych komórek wzrasta na nich ekspresja cząsteczki CD86. Co ważne, kontakt komórek Treg z CD80+ lub CD86+ komórek dendrytycznych odpowiednio: nasila lub hamuje ich funkcje supresorowe [94]. Z kolei komórki Treg działają supresyjnie na „sąsiednie” komórki T, które wiążą się do tej samej APC. Przy braku infekcji (ryc. 1A), gdy kontrola komórek autoreaktywnych przez Treg jest wskazana, APC cechuje podstawowy poziom ekspresji cząsteczek CD80/86 i niski cząsteczek MHC II, dzięki czemu ich zdolność prezentacji autoAg jest mała. Komórki Treg CD4+CD25+ rozpoznające autoAg mogą jednak ulegać aktywacji po otrzymaniu sygnału kostymulacji, dostarczanego przez cząsteczkę CTLA-4, która z bardzo wysokim powinowactwem wiąże cząsteczki CD80/86 obecne na APC. Tak aktywowane komórki Treg mogą działać supresyjnie na limfocyty autoreaktywne. Sytuacja zmienia się podczas infekcji ze względu na konieczność aktywacji i ekspansji komórek efektorowych (Tef). Wówczas aktywność supresyjna limfocytów Treg jest obniżana dzięki sygnałom przekazywanym tym komórkom przez inne cząsteczki powierzchniowe (GITR, CD28) oraz interleukinę 2 (IL-2) (ryc. 1B) [75]. Oprócz tego, poziom supresji jest determinowany przez siłę sygnału pochodzącego z TCR komórek efektorowych: gdy sygnał jest słaby, supresja jest możliwa, a gdy silny, świadczący o zapaleniu, to komórki efektorowe stają się odporne na supresję [5]. Po wyeliminowaniu czynnika infekcyjnego, wraz ze spadkiem aktywacji APC, właściwości supresorowe komórek Treg są przywracane.

b) Stymulacja przez TLRs reguluje właściwości Treg

Podczas infekcji ważna jest też „ilość”/stężenie Ag bakteryjnych (np. LPS), ponieważ od tego zależy, czy będą aktywowane limfocyty T efektorowe czy Treg. Na komórkach prezentujących Ag obecne są receptory Toll-podobne (TLRs), które rozpoznają struktury charakterystyczne dla drobnoustrojów (PAMPs – ang. *pathogen associated molecular patterns*) oraz niektóre endogenne cząsteczki uwalniane podczas zapalenia (DAMPs – ang. *danger associated molecular patterns*). Rozpoznanie tych ligandów przez TLRs zapoczątkowuje odpowiedź immunologiczną: dojrzewanie DCs, produkcję cytokin prozapalnych i chemokin [44]. Okazuje się, że odpowiedź immunologiczna może być



	BRAK INFЕКCJI	INFЕКCJA
APC	podstawowy poziom CD80/86, MHC II	↑↑ ekspresji CD80/86, MHC II
Treg	funkcje supresorowe wywierane przez CTLA-4	zahamowanie funkcji supresorowych przez sygnały pochodzące od: GITR, CD28, IL-2

RYCINA 1. Funkcje supresorowe Treg są regulowane poprzez oddziaływanie z innymi komórkami układu immunologicznego. W stanie fizjologicznym funkcje supresorowe Treg są zachowane (A). Podczas infekcji duże stężenia IL-2, stymulacja TCR, a także stymulacja CD28 powodują osłabienie funkcji Treg, co pozwala na efektywniejsze zwalczanie infekcji (B). Treg – komórka regulatorowa, Tef – komórka efektorowa, APC – komórka prezentująca antygen; na podstawie pracy [75]

FIGURE 1. Signalling from other cells to Treg through many surface molecules leads to augmentation or attenuation of their suppressive activity. Under the physiological conditions Treg are able to suppress the effectors (A). In the presence of high dose IL-2 together with TCR stimulation or stimulation through CD28 Treg lose their functions, what allow to control the infection. Treg – regulatory T cell, Tef – effector T cell, APC – antigen presenting cell; based on the paper [75]

regulowana także poprzez bezpośrednią stymulację komórek CD4+CD25+ przez obecne na nich TLRs. Wykazano, że LPS działający przez TLR4 [18], a także flagellina będąca ligandem dla TLR5 [24] nasilają właściwości supresorowe komórek Treg. Natomiast równoczesna stymulacja tych komórek poprzez TCR i TLR2 [80] lub bezpośrednia stymulacja przez TLR8 [69] powoduje utratę funkcji supresorowych. Jest więc prawdopodobne, że różne ligandy TLR mogą wpływać odmiennie na funkcje komórek Treg.

Dla regulacji odpowiedzi immunologicznej istotna jest również reaktywność na ligandy TLR mniejsza komórek Treg niż DC. Na przykład stężenie LPS (ligand TLR4) potrzebne do aktywacji komórki Treg jest o kilka rzędów wielkości wyższe od stężenia aktywującego DC. Podobne różnice obserwowano stosując agonistę TLR2 [54]. Przypuszcza się zatem, że podczas infekcji ligandy TLRs (np. LPS) aktywują najpierw DCs, co inicjuje odpowiedź immunologiczną prowadzącą do aktywacji i ekspansji komórek efektorowych. Następnie, przy wyższych stężeniach tych ligandów aktywo-

wane są komórki Treg, co z kolei ogranicza odpowiedź przeciwbakteryjną i zapobiega miejscowej lub systemowej patologii np. sepsie. Infekcjom często towarzyszą uszkodzenia tkanek, a tworzące się środowisko zapalne ułatwia prezentację uwalnianych autoAg. Uważa się, że komórki Treg mogą kontrolować aktywację i ekspansję autoreaktywnych komórek T, które są przyciągane do miejsca zapalenia przez APC [75]. W takich warunkach komórki nTreg mogą odpowiadać także na antygeny mikroorganizmów wykazujące podobieństwo do autoAg (reaktywność krzyżowa) [10]. Również antygeny z bakterii patogennych i bakterii tworzących florę jelitową mogą być rozpoznawane krzyżowo przez komórki Treg. W wielu modelach infekcji, usunięcie z organizmu flory bakteryjnej bądź jej modyfikacja powoduje wzrost podatności gospodarza na infekcje [10]. Takie obserwacje przemawiają za hipotezą, że flora jelitowa kształtuje repertuar komórek nTreg. Interakcje komórki gospodarza - patogen są zmienne w czasie, podobnie jak Ag rozpoznawane przez komórki Treg. Ponieważ w interesie patogenów leży jak najdłuższe przeżycie gospodarza, w pewnych sytuacjach mogą one tworzyć warunki sprzyjające aktywacji, migracji czy przeżyciu komórek regulatorowych. Podczas przewlekłych infekcji organizm gospodarza wytwarza duże ilości czynnika transformującego  $\beta$  (TGF- $\beta$  – ang. *transforming growth factor- $\beta$* ), który jest jedną z kluczowych cytokin dla przeżycia i zachowania funkcji Treg [10].

### c) Kontakt Treg z komórkami docelowymi może wpływać na ich czynność supresorową

Coraz więcej danych przemawia za tym, że komórki Treg, aktywowane w fazie inicjacji odpowiedzi immunologicznej, hamują aktywność nie tylko efektorowych limfocytów T (jak sądzono dotychczas), ale także innych komórek uczestniczących w tej odpowiedzi. Wydaje się, że w tym celu komórki Treg mogą wykorzystywać różne mechanizmy. Z kolei kontakt z komórkami docelowymi może, poprzez mechanizm zwrotny, ponownie modulować aktywność limfocytów Treg [15]. Przemawiają za tym następujące obserwacje. W wyniku interakcji cząsteczki CTLA-4 na limfocytach Treg z cząsteczkami B7 na DC, w tych ostatnich komórkach indukowany jest enzymIDO (IDO – ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*), który degraduje tryptofan do kynureniny i innych produktów [30]. Ekspresja IDO jest też indukowana przez IFN- $\gamma$ , wytwarzany głównie przez pomocnicze limfocyty T typu 1 (Th1). Tryptofan jest aminokwasem niezbędnym do przeżycia komórek, a jego brak powoduje anergię komórek efektorowych.

Z drugiej strony, jeden z produktów degradacji tryptofanu, kwas 3-hydroksyantranilowy (HA), indukuje w komórkach ekspresję innego enzymu, oksygenazy hemowej (HO-1 – ang. *heme oxygenase 1*) [64]. Najnowsze badania wskazują, że aktywność HO-1 może być kluczowa dla pełnienia przez komórki Treg funkcji supresorowej. Wykazano bowiem, że komórki Treg CD25+, w przeciwieństwie do komórek CD25-, mają konstytutywną ekspresję HO-1 [66]. Co więcej, po transfekcji komórek Jurkat (linia nowotworowych ludzkich limfocytów T) czynnikiem Foxp3, wykazują one także ekspresję HO-1, a aktywność supresorowa takich komórek, jak i naturalnych Treg CD4+CD25+ jest blokowana przez inhibitor HO-1 [20]. Co ciekawe, nadekspresja HO-1 prowadzi *in vivo* do supresji odpowiedzi immunologicznej i

przedłuża przeżywanie przeszczepów, najprawdopodobniej w wyniku indukcji AICD (AICD – ang. *activation-induced cell death*) w alloreaktywnych komórkach T [58]. Oksygenaza hemowa jest odpowiedzialna za rozkład hemu do biliwerdyny, jonów Fe i tlenku węgla (CO). Wydaje się, że komórki Treg mogą działać supresorowo dzięki wytwarzaniu CO, który wykazuje szerokie właściwości antyproliferacyjne [74]. Antyproliferacyjny mechanizm działania CO polega na blokowaniu produkcji IL-2, głównej cytokiny odpowiedzialnej za proliferację limfocytów T [67]. Co ciekawe, wrażliwość limfocytów T pomocniczych typu 1 (Th1) i typu 2 (Th2) na supresję ze strony nTreg jest zróżnicowana. Komórki Th2, które produkują i odpowiadają na cytokiny inne niż IL-2 (tj. IL-4, IL-9), są mniej podatne na supresję wywieraną przez limfocyty CD4+CD25+ niż komórki Th1. W przypadku limfocytów Th1 tylko IL-15 znosiła supresyjny wpływ nTreg. Sugeruje to istnienie odmiennych mechanizmów regulujących odpowiedzi Th1 i Th2 [22].

Komórki Treg kontrolują nie tylko działanie limfocytów T. Wykazano bowiem, że komórki CD4+CD25+ mogą hamować proliferację limfocytów B, szczególnie tych, które prezentują właśnie Ag. Ten efekt jest zależny od kontaktu pomiędzy komórkami, podczas którego komórki Treg uwalniają czynniki cytotoksyczne: perforyny i granzymy [93]. Co więcej, komórki Treg są obecne w strefach komórek B i ośrodkach rozmnażania wtórnych narządów limfatycznych, gdzie po kontakcie komórek T i B następuje inicjacja odpowiedzi humoralnej [52]. Tam, Treg w sposób bezpośredni hamują wytwarzanie i zmianę klas przeciwciał przez limfocyty B [52]. Wyniki te sugerują, że komórki Treg zapobiegają odpowiedzi autoimmunizacyjnej m.in. poprzez bezpośredni wpływ na czynność limfocytów B. Pojawiają się także doniesienia o wzajemnej kontroli komórek Treg i komórek NKT (NKT – ang. *natural killer T cells*) [47].

#### d) Komórki Treg wykazują odmienną wrażliwość na apoptozę niż komórki efektorowe

Ważnym mechanizmem kontrolującym przebieg odpowiedzi immunologicznej jest apoptoza, czyli programowana śmierć komórki. Kluczowym receptorem śmierci jest cząsteczka CD95 (Fas), która występuje m.in. na limfocytach i inicjuje ich apoptozę po przyłączeniu swoistego ligandu (CD95L/FasL). CD95L występuje zarówno na powierzchni komórek, jak i w formie rozpuszczalnej. Wrażliwość limfocytów T na apoptozę zmienia się w zależności od stanu aktywacji i jest różna w różnych fazach odpowiedzi immunologicznej. Szereg obserwacji wskazuje, że podczas przebiegu odpowiedzi immunologicznej wrażliwość komórek Treg na apoptozę zmienia się przeciwnie do wrażliwości efektorowych limfocytów T. W przeciwieństwie do większości spoczynkowych limfocytów T, które są stosunkowo odporne na apoptozę, unikalną właściwością niestymulowanych komórek Treg CD4+CD25+Foxp3+ [32], ale nie dziewiczych Treg izolowanych z krwi pępowinowej [33], jest wrażliwość na apoptozę indukowaną CD95L. Te różnice ułatwiają zapoczątkowanie odpowiedzi immunologicznej. Odmiennie, aktywowane efektorowe limfocyty T stają się szczególnie podatne na śmierć apoptotyczną indukowaną przez aktywację (AICD), co umożliwia ich eliminację w fazie wygaszania odpowiedzi immunologicznej. Natomiast wrażliwość komórek Treg na AICD jest znacznie mniejsza, co ułatwia zakończenie odpowiedzi

immunologicznej. Wydaje się, że komórki Treg są zabijane później przez rozpuszczalny CD95L lub też CD95L występujący np. na umierających komórkach efektorowych. Końcowej eliminacji komórek Treg sprzyja też drastyczne obniżenie stężenia IL-2, cytokiny produkowanej głównie przez efektorowe limfocyty T. Tak więc subtelna równowaga pomiędzy efektorowymi i regulatorowymi komórkami T wydaje się być ściśle kontrolowana na wszystkich etapach odpowiedzi immunologicznej [32].

Sprawność układu odpornościowego maleje wraz z wiekiem, co powoduje wzrost podatności na infekcje i nowotwory oraz cięższy przebieg chorób przewlekłych. Być może jest to związane z nasileniem ogólnej aktywności supresorowej, gdyż u ludzi stwierdza się wraz z wiekiem wzrost liczby komórek o fenotypie regulatorowym [36]. Wraz z wiekiem rośnie również liczba limfocytów T różnicujących się poza grasycą (np. w wątrobie). Udział komórek supresorowych powstałych w grasicy i poza nią w ogólnej puli CD4+CD25+ na obwodzie nie jest znany, ale zdolność powstawania tych komórek *de novo* we wtórnych narządach limfatycznych może być istotna dla wytworzenia i utrzymywania antygenowo swoistej tolerancji. Niestety, ta droga może być także wykorzystywana przez komórki nowotworowe, które w ten sposób zapobiegają odpowiedzi immunologicznej swoistej dla antygenów nowotworowych [45].

### Kontrola odpowiedzi immunologicznej podczas ciąży i wpływ hormonów na komórki Treg

Wyniki najnowszych badań, a zwłaszcza ocena ilościowa i czynnościowa limfocytów Treg podczas ciąży, wskazują dobitnie na regulacyjny wpływ hormonów na tę subpopulację komórek. U kobiet w ciąży, począwszy od pierwszego trymestru, obserwuje się stopniowy wzrost liczby komórek Treg w krwi obwodowej, a następnie już po porodzie jej spadek [79]. Podobne badania na myszach wskazują na duży udział procentowy tej populacji pośród komórek CD4+ błony śluzowej macicy [37]. Co ciekawe, zjawisko to obserwowane jest jeszcze przed implantacją zarodka, nie jest więc indukowane przez alloantygeny (alloAg) zarodkowe [59].

Estrogen (17- $\beta$ -estradiol) zwiększa ekspresję Foxp3 i CD25 *in vitro* oraz ekspresję Foxp3 i ilość komórek regulatorowych *in vivo* [70]. Oprócz wzrostu liczby limfocytów Treg i supresji czynnościowej komórek efektorowych, w ciąży obserwuje się też charakterystyczny wpływ komórek Treg na APC – indukcję enzymuIDO. Uważa się, że brak tryptofanu, będący skutkiem aktywności enzymatycznejIDO, jest jednym z czynników powodujących anergię komórek efektorowych, dzięki czemu utrzymywana jest tolerancja na alloAg płodu [31]. W ciąży obserwuje się nie tylko znaczny wzrost liczby komórek CD4+CD25+ [37, 79], ale i populacji Tr1 produkującej IL-10, co może częściowo uczestniczyć w remisji takich schorzeń autoimmunizacyjnych jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Wszystkie te mechanizmy współuczestniczą w zapewnieniu tolerancji układu immunologicznego matki na alloAg zarodka, co w efekcie pozwala na utrzymanie ciąży. Komórki regulatorowe nie tylko pełnią rolę w utrzymaniu ciąży, ale także, zgodnie z ostatnimi doniesieniami, mogą być warunkiem kobiecej płodności. Wykazano bowiem, że stan niepłodności o niewyjaśnionej etiologii jest związany z obniżonym poziomem ekspresji czynnika Foxp3 w endometrium [40].

Niedobór estrogenu u kobiet po menopauzie może prowadzić, jak się przypuszcza, do wstrzymania funkcji supresyjnych komórek Treg i równoczesnej aktywacji limfocytów efektorowych, co w konsekwencji może stanowić jedną z przyczyn osteoporozy [83]. W tym przypadku aktywacji APC i komórek efektorowych sprzyja wysoki poziom IFN- $\gamma$ , którego produkcja wzrasta przy braku estrogenu.

## KOMÓRKI REGULATOROWE W STANACH PATOLOGICZNYCH I POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE

Doniesienia ostatnich lat wskazują na związek pomiędzy nieprawidłowościami czynnościowymi i ilościowymi komórek Treg a występowaniem niektórych schorzeń u ludzi [50, 73].

### Kiedy nadczynność komórek Treg jest niekorzystna

Nadczynność limfocytów Treg może powodować stan wyhamowania mechanizmów efektorowych, prowadzący do choroby, a nawet śmierci gospodarza. Zjawisko to może występować w chorobach nowotworowych, infekcjach wirusowych i zakażeniach pasożytniczych [50]. W przypadku niektórych nowotworów stwierdza się zwiększoną liczbę komórek Treg na obwodzie, są one także obecne w guzach [56, 90] lub w strefie okołoguzowej [91]. Według badań Curiel i wsp. komórki Treg odpowiadają na chemokinę CCL22, dzięki czemu akumulują się preferencyjnie w guzach nowotworowych, omijając węzły chłonne [25]. Ta nietypowa migracja może stanowić istotny mechanizm tolerancji na antygeny nowotworowe. Oprócz tego, w chorobach nowotworowych obserwuje się często wzmożoną ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2) i w konsekwencji nadprodukcję prostaglandyny E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), która nie tylko nasila funkcje supresorowe komórek Treg, ale także indukuje fenotyp regulatorowy (ekspresję Foxp3) w populacji limfocytów CD4+CD25- [6, 77]. Co więcej, ta indukowana przez nowotwory ekspansja komórek Treg przebiega nawet u myszy po tymektomii [85]. Ostatnie doniesienia wskazują, że jednym z mechanizmów prowadzących do progresji nowotworu jest zmniejszenie subpopulacji cytotoksycznych limfocytów T CD8+ przez komórki Treg [91]. Sugeruje się również, że same komórki Treg wykazują ekspresję COX-2 i mogą hamować odpowiedź efektorowych limfocytów T w sposób zależny od PGE<sub>2</sub> [57]. Zatem, potencjalnym podejściem terapeutycznym w leczeniu nowotworów może być obniżenie liczby lub czynności komórek Treg. W tym celu można wykorzystać ich charakterystyczną podatność na apoptozę indukowaną przez FasL [32] bądź dążyć do zahamowania syntezy PGE<sub>2</sub>, np. poprzez blokowanie aktywności enzymatycznej COX-2. Wstępne badania u chorych z nowotworem wskazują, że takie postępowanie może być korzystne terapeutycznie. Wykazano bowiem, że usunięcie komórek Treg u chorych z nowotworem nerki (RCC – ang. *renal cell carcinoma*) wzmacnia swoistą odpowiedź przeciwnowotworową indukowaną przez szczepionki zawierające DCs transfekowane nowotworowym RNA [26].



Także w niektórych zakażeniach pasożytniczych i wirusowych usunięcie komórek nTreg przynosi korzyść terapeutyczną. Wykazano bowiem, że w mysim modelu malarii usunięcie komórek nTreg przywraca skuteczną odpowiedź immunologiczną i chroni przed śmiercią, a w mysim modelu leiszmaniozy obecność komórek Treg powoduje nawrót choroby i zahamowanie mechanizmów pamięci immunologicznej [10]. Również odpowiedź immunologiczna na wirus opryszczki zwykłej (HSV – ang. *herpes simplex virus*) jest znacznie silniejsza przy braku nTreg, a usunięcie tej populacji z krwi obwodowej ludzi chorych na AIDS zwiększa odpowiedź przeciwko wirusowi ludzkiego niedoboru odporności (HIV – ang. *human immunodeficiency virus*). Należy jednak podkreślić, że same komórki Treg są także podatne na infekcje wirusowe, np. HIV [10] czy HTLV-I [34], co w niektórych przypadkach prowadzi do utraty ich funkcji [34].

Strategie terapeutyczne wycelowane w modulację liczby lub funkcji komórek regulatorowych niosą ze sobą ogromne możliwości. Nadmierna kontrola odpowiedzi efektorowej przez komórki nTreg jest niekorzystna dla gospodarza, gdyż prowadzi do namnożenia patogena lub wzrostu nowotworu. Tak więc usunięcie komórek Treg bądź zastosowanie terapii blokujących ich funkcje przywracałoby organizmowi zdolność kontroli tych zjawisk [10] i jest pożądane w przypadku potrzeby wzmocnienia odpowiedzi przeciw danym antygenom (w chorobach nowotworowych, przewlekłych zakażeniach, szczepieniach ochronnych).

### Kiedy niedobory komórek Treg stanowią zagrożenie

Z drugiej strony zbyt mało komórek Treg oznacza nasilenie mechanizmów efektorowych, co w niektórych warunkach może stanowić zagrożenie dla integralności własnych tkanek i kontroli zjawisk autoimmunizacyjnych. Niedobór komórek CD4+CD25+ stwierdza się w modelach wielu chorób autoimmunizacyjnych: reumatoidalnego zapalenia stawów, stwardnienia rozsianego, cukrzycy, tocznia, zapalenia jelita grubego, zapalenia jajników i innych [11]. Wzmocnienie liczby i/lub aktywności limfocytów Treg jest więc oczywistym celem w przypadku chorób autoimmunizacyjnych, alergii i odrzucania przeszczepów.

#### a) Przeszczepy

Obecnie strategie terapeutyczne zmniejszające ryzyko odrzucenia przeszczepu u ludzi opierają się na lekach immunosupresyjnych, usunięciu populacji limfocytów T (zarówno cytotoksycznych, jak i helperowych) lub blokadzie sygnałów kostymulujących. Podstawową ich wadą jest brak specyficzności antygenowej, co z kolei zwiększa ryzyko zakażeń i obniża efektywność ewentualnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Dlatego też szczególne znaczenie dla transplantologii może mieć wiedza jak otrzymać komórki Treg specyficzne dla prezentowanego Ag [95]. Takie komórki Treg udało się otrzymać z populacji limfocytów CD4+CD45RA+ poprzez aktywację, z użyciem swoistego ligandu Jagged-1, ewolucyjnie konserwatywnych receptorów Notch, które regulują procesy różnicowania komórkowego [92]. Sugeruje to możliwość kontroli alloreaktywności przy zachowaniu innych funkcji limfocytów T. Szereg doniesień wskazuje na udział komórek CD4+CD25+ w regulacji odpowiedzi immunologicznej i ochronie biorcy przed śmiertelną

chorobą – przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD – ang. *graft versus host disease*) podczas allogenicznego przeszczepu szpiku kostnego czy całych narządów [1, 19, 82]. Wydaje się, iż za tę kontrolę odpowiadają komórki CD4+CD25+ biorcy lub dawcy o wysokiej ekspresji L-selektyny [82], choć wcześniejsze badania wskazywały na udział tylko komórek Treg dawcy [39]. Wykazano także, że podanie komórek Treg podczas przeszczepu wysepek Langerhansa znacznie obniża ryzyko odrzucenia lub degradacji komórek beta. To protekcyjne działanie wiąże się ze zdolnością komórek Treg do hamowania układu odporności wrodzonej i obniżania ekspresji chemokin w wysepkach, co zatrzymuje migrację efektorowych limfocytów T do przeszczepu [19]. Należy pamiętać, że limfocyty Treg działają supresyjnie nie tylko na komórki autoreaktywne, ale na wszystkie „sąsiednie” limfocyty T, będące w kontakcie z tą samą APC. Tak więc limfocyty rozpoznające obce białka (patogeny, alergeny, Ag pokarmowe) także podlegają tej supresji. Jest ona korzystna dla pacjentów z alergiami czy biorców przeszczepów, choć podnosi ryzyko infekcji [11].

#### b) Choroby autoimmunizacyjne

Protekcyjną rolę komórek Treg udowodniono w wielu modelach chorób autoimmunizacyjnych u zwierząt [51, 73]. Zaburzenia funkcjonalne Treg stwierdza się także w niektórych schorzeniach tego typu u ludzi, np. u chorych na stwardnienie rozsiane [88], czy z zespołem wielogruzołowej niedoczynności dokrewnej (APSII – ang. *autoimmune polyglandular syndrome type II*) [46]. Pewne obserwacje wskazują, że towarzyszą one także niektórym chorobom reumatycznym, ale doniesienia dotyczące tego zagadnienia są jeszcze niepełne i często niejednoznaczne.

Choroby reumatyczne należą do przewlekłych chorób autoimmunizacyjnych, w których szereg zjawisk prozapalnych prowadzi do uszkodzenia chrząstki stawowej. Nie jest jasne, czy komórki Treg działają protekcyjnie w zapaleniu stawów u myszy, gdyż w zależności od badanego modelu obserwowano różny efekt. Myszy pozbawione komórek CD25+ immunizowane kolagenem typu II (model CIA), wykazywały nasilone objawy zapalenia stawów, ustępujące po podaniu komórek CD25+ [62]. Z kolei w modelu PGIA, indukowanym przez podanie myszom proteoglikanów, nie wykazano wpływu komórek Treg na przebieg choroby [7]. Co ciekawe, w obydwu modelach limfocyty Treg były funkcjonalne *in vitro*.

Zgodnie z większością badań, komórki regulatorowe CD4+CD25+ izolowane z krwi obwodowej pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) wykazują wiele podobieństw do tych izolowanych od osób zdrowych: mają zbliżony fenotyp (ekspresja cząsteczek: CD69+, MHC II+, OX-40+, CTLA-4 jest wyższa niż na komórkach CD25-) [87], stanowią podobny udział procentowy we krwi [16] i wykazują właściwości supresorowe *in vitro* [16, 29, 87]. Większość subpopulacji Treg ze stawów stanowią aktywowane komórki pamięci o fenotypie CD45RO, CD122, CD58, CD71, HLA-DR wykazując przez to podobieństwo do limfocytów Treg pochodzących z krwi zarówno osób zdrowych, jak i chorych na RZS [16]. Ponadto komórki Treg ze stawów wyróżniają się wyższą ekspresją CTLA-4, GITR i HLA-DR niż Treg z krwi, co może świadczyć o dojrzewaniu tej populacji w stawie [16, 27].

Ostatnie badania sugerują, że komórki regulatorowe Foxp3<sup>+</sup> w stawie mogą być identyfikowane za pomocą koekspresji CD25 i CD27 [72]. U większości chorych stwierdzono zdecydowanie mniejszą niż u osób zdrowych liczbę komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> o wybitnych właściwościach regulatorowych (lub według niektórych badaczy właściwą populację Treg) [17, 27]. Niektóre doniesienia wskazują jednak na upośledzenie ilościowe innej subpopulacji komórek regulatorowych, mianowicie Tr1, we krwi i płynie stawowym chorych na RZS [11]. Obniżoną liczbę komórek Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> obserwowano także w toczniu rumieniowatym układowym [60] i toczniu dziecięcym [49]. Natomiast w zespole Sjögrena nie stwierdzono ani obniżonej liczby limfocytów Treg, ani ich dysfunkcji [48]. W wielu chorobach reumatycznych wykazano natomiast akumulację komórek Treg w stawach objętych procesem chorobowym [16, 17, 27, 87]. Co więcej, populacja Treg w stawie była liczniejsza niż we krwi obwodowej tych samych pacjentów, niezależnie od rodzaju schorzenia (łuszczycowe zapalenie stawów, spondyloartropatie, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, RZS) [17]. Co ciekawe, komórki Treg izolowane ze stawów wykazywały działanie supresyjne (hamowały proliferację) nie tylko względem komórek CD25<sup>-</sup> pochodzących ze stawu, ale także tych izolowanych z krwi [16]. Ponadto działanie supresyjne komórek Treg ze stawów było silniejsze niż komórek Treg pochodzących z krwi osób chorych lub zdrowych [27, 87].

Doniesienia na temat wpływu komórek Treg na produkcję cytokin biorących udział w patogenezie RZS są rozbieżne. Niektórzy badacze wykazali, że komórki Treg izolowane z płynów stawowych hamują produkcję TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-13 i IL-17 [17, 87]. Natomiast badania Ehrensteina i wsp. [29] wskazują, że komórki Treg izolowane z krwi chorych na RZS (w przeciwieństwie do tych izolowanych od ludzi zdrowych), nie hamują produkcji cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) przez aktywowane limfocyty T i monocyty, a także nie indukują różnicowania dodatkowej subpopulacji Treg z komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Jak wykazano, wynika to z upośledzenia czynnościowego limfocytów Treg, a nie oporności komórek efektorowych na ich działanie. Leczenie polegające na neutralizacji czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$  – ang. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) przywracało te funkcje całkowicie, powodowało także wzrost liczby komórek regulatorowych we krwi pacjentów [29], prawdopodobnie m.in. poprzez obniżenie ich spontanicznej apoptozy [71]. Co więcej, po leczeniu obserwowano wzrost liczby komórek produkujących IL-10, a spadek tych produkujących TNF- $\alpha$  [29]. Ostatnie badania wykazały, iż TNF- $\alpha$  hamuje funkcje supresorowe naturalnych i indukowanych komórek Treg obniżając w nich ekspresję Foxp3 [84]. Wyniki van Amelsfort [87] wykazały jednak supresyjny wpływ komórek Treg pochodzących z krwi chorych na RZS na produkcję TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , pomimo że większość pacjentów biorących udział w badaniu nie była leczona terapią anti-TNF $\alpha$ . Limfocyty T od pacjentów chorych na RZS paradoksalnie wykazują obniżoną odpowiedź na stymulację (swoistą anergię), co może wynikać z długotrwałej ekspozycji na TNF- $\alpha$ . Przypuszcza się również, że komórki Treg są szczególnie wrażliwe na działanie tej cytokiny, gdyż TNF- $\alpha$  wpływa na komórki T jeszcze w grasicy, a grasicze CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ludzi zdrowych mają, w porównaniu z komórkami CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, zwiększoną ekspresję receptora typu II dla TNF- $\alpha$  (TNFR2) [3]. Fakt ten może

tłumaczyć, dlaczego u chorych na RZS terapia anty-TNF- $\alpha$  przywraca prawidłowy stan fizjologiczny komórek Treg.

Pomimo opisanej powyżej akumulacji komórek Treg w stawach, w żadnej z badanych grup pacjentów (łuszczycowe zapalenie stawów, spondyloartropatie, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, RZS) nie stwierdzono korelacji pomiędzy liczbą komórek Treg w płynie stawowym czy we krwi a nasileniem objawów lub czasem trwania choroby [17]. Z drugiej strony, we krwi dzieci chorych na przetrwałe młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów z zajęciem niewielu stawów (pers-OA JIA – ang. *persistent oligoarticular juvenile idiopathic arthritis*), chorobie wyjątkowej wśród chorób autoimmunizacyjnych ze względu na samoistną remisję, wykazano znaczny wzrost komórek CD4+CD25<sup>bright</sup> FoxP3+, w porównaniu z tzw. rozszerzającym się podtypem tej choroby (ext-OA JIA – ang. *extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis*), przebiegającym bez remisji [27]. Wyniki te mogą sugerować udział komórek Treg w remisji pers-OA JIA.

Wzrost liczby komórek Treg w stawach, z jednoczesnym spadkiem we krwi, może świadczyć o aktywnej migracji komórek z obwodu do tkanek stawu objętych procesem zapalnym [17]. W wielu modelach infekcyjnych (HSV, leishmania, schistosoma) wykazano, że limfocyty nTreg gromadzą się w zainfekowanych narządach [10]. Podczas chronicznych infekcji, krew może nie być odpowiednią tkanką do oceny obecności tej subpopulacji komórek. Podobnie przypuszcza się, że obniżenie liczby funkcjonalnych limfocytów nTreg we krwi pacjentów zakażonych HIV [2] czy HCV [13] może odzwierciedlać raczej redystrybucję tych komórek niż faktyczne obniżenie ich liczby. Za migrację komórek Treg do tkanek zapalnych mogą odpowiadać chemokiny CC4 i CC8, gdyż komórki te wykazują ekspresję receptorów swoistych dla tych właśnie chemokin. Co więcej, chemokiny te są wytwarzane *in situ*, głównie przez DCs, B i aktywowane makrofagi. Nie można też wykluczyć miejscowego namnażania komórek Treg w stawie objętym procesem zapalnym [17].

Dlaczego niekiedy działanie supresorowe komórek Treg jest nieskuteczne

Warunkami niezbędnymi skutecznej kontroli odpowiedzi immunologicznej przez komórki Treg jest nie tylko ich aktywność supresorowa, ale także podatność na tę supresję limfocytów efektorowych. Wyraźnie obniżoną podatność limfocytów CD4+CD25- na działanie komórek Treg CD4+CD25+ obserwowano w mysim modelu tocznia układowego (myszy MRL/Mp) [61]. Wykazano również, że całkiem niewrażliwe na supresję wywieraną przez komórki Treg są limfocyty CD4+CD25- izolowane od myszy pozbawionych dwóch czynników transkrypcyjnych NFAT: NFATc2/c3<sup>-/-</sup>. NFAT są krytycznymi aktywatorami odpowiedzi immunologicznej, gdyż kontrolują m.in. ekspresję genów dla cytokin i cząsteczek powierzchniowych. Udowodniono, że brak NFATc2/c3 obniża próg aktywacji komórek T, co w obecności IL-2 pozwala komórkom efektorowym „uciec od supresji” [12].

Dlaczego pomimo obecności komórek regulatorowych w stawie u osób z chorobami reumatycznymi, możliwy jest miejscowy rozwój chronicznego zapalenia i reakcji autoimmunologicznych? Po pierwsze, być może gdyby nie ich obecność w stawie

reumatycznym, przebieg choroby byłby znacznie bardziej agresywny. Po drugie, pomimo zwiększonej liczby komórek Treg w płynie stawowym, może być ich nadal zbyt mało, aby efektywnie zahamować rozwój choroby. Ponadto badania histochemiczne wskazują, że limfocyty T infiltrujące błonę maziową, gdzie toczy się proces zapalny, rzadko wykazują ekspresję CD25. Dalszych badań wymaga potwierdzenie, czy są to faktycznie komórki regulatorowe, czy też aktywowane patogenne komórki CD4+.

Wydaje się także, że za „oporność” komórek efektorowych na supresję odpowiedzialne są cytokiny: IL-6 [68], IL-7 i IL-15 [72], IL-2 i IL-15 [28]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku chorób, w których patogenezie cytokiny te biorą udział, np. w RZS. W reumatoidalnych stawach panują warunki osłabiające efektywne działanie komórek Treg: wysokie stężenie IL-6, która znosi supresyjne działanie Treg [68], niski poziom IL-2 wpływający na ich funkcjonalność [63], a także obecność cząsteczek kostymulujących (np. CD28) [86]. Nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem IL-6 a utratą funkcji supresorowych przez komórki Treg izolowane z krwi pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane [88]. Natomiast czynnik płytkowy 4 (PF4), choć stymuluje proliferację komórek CD4+CD25+, powoduje także utratę ich właściwości supresorowych. Ponieważ jedynym źródłem PF4 są płytki, te obserwacje przemawiają za udziałem komórek Treg w patogenezie trombocytopenii – choroby o podłożu immunologicznym, związanej z aktywacją płytek [53]. Ponieważ w niektórych tkankach czynność komórek Treg może być znacznie ograniczona przez powyższe cytokiny, to terapie neutralizujące te cytokiny mogą nie tylko obniżyć aktywację komórek T, ale także przywracać funkcje supresorowe komórek Treg [72].

Wpływ na czynność nTreg mają także podstawowe leki immunosupresyjne. Na modelach zwierzęcych wykazano, że cyklosporyna oraz cyklofosfamid indukują autoimmunizację, hamując bardziej funkcje supresorowe komórek CD4+CD25+ niż czynność komórek autoreaktywnych [11]. Z kolei rapamycyna – lek immunosupresyjny zapobiegający odrzucaniu przeszczepów, w warunkach *in vitro* selektywnie stymuluje rozwój mysich komórek CD4+CD25+FOXP3+ [9]. *In vitro* leki immunosupresyjne stymulują też proliferację innej populacji komórek regulatorowych – Tr1 [8]. Ten rodzaj leków stanowi podstawę leczenia chorób autoimmunizacyjnych, w tym chorób reumatycznych. Jednak w chorobach reumatycznych akumulację komórek CD4+CD25+ w stawie obserwuje się niezależnie od rodzaju choroby i stosowanej terapii [17]. Może to wskazywać na próby organizmu zmierzające do ograniczenia chronicznego zapalenia.

### Czy można *ex vivo* namnożyć komórki Treg do celów terapeutycznych

Skuteczność immunoterapii z wykorzystaniem komórek regulatorowych jest zależna od dwóch warunków: swoistości antygenowej tych komórek i umiejętności ich namnożenia *ex vivo* bez utraty potencjału supresorowego. Pomimo anergii obserwowanej *in vitro*, w pewnych warunkach komórki Treg CD25+ mogą namnażać się w sposób zależny od antygeny i bez utraty właściwości supresorowych zarówno *in vivo* [23, 89], jak i *in vitro* [35, 38, 41]. Udowodniono, że użycie antygenowo swoistych komórek Treg obniża ich liczbę potrzebną dla efektywnej immunoterapii [42]. U myszy NOD, u których spontanicznie dochodzi do rozwoju cukrzycy typu I, wykazano ponadto,

że antygenowo swoiste komórki Treg mają większe działanie protekcyjne niż komórki namnożone w wyniku stymulacji poliklonalnej [81]. Jako krytyczną dla proliferacji różnych subpopulacji komórek regulatorowych, np. Tr1 [4], a także CD4+CD25+ [43], proponuje się ostatnio IL-15. Poprzez stymulację antygenem i IL-15 udało się otrzymać z populacji CD4+ komórki regulatorowe, których funkcja supresorowa nie jest zależna od TGF- $\beta$ , IL-10 ani CTLA-4 [43]. Proliferację komórek CD4+CD25+ bez utraty funkcji indukują także dojrzałe komórki DC wywodzące się ze szpiku kostnego (BMDC – ang. *bone marrow-derived DC*) [14]. Są to jedyne spośród wielu subpopulacji DC komórki mające taką właściwość. Co ciekawe, tak namnożone limfocyty Treg nie hamują proliferacji komórek CD4+CD25-, ale znacznie ograniczają ich zdolność do wytwarzania IL-2. Wyniki Skapenko i wsp. wskazują, że także cytokiny produkowane przez limfocyty Th2 (IL-4 i IL-13) mogą odgrywać ważną rolę w antygenowo zależnym, pozagasiczym powstawaniu komórek Treg (Foxp3+CD25+) [78]. Z kolei IL-4, dodana do hodowli zawierającej już komórki Treg i efektorowe (CD25-), znosi supresorowe działanie limfocytów Treg i zwiększa przeżycie subpopulacji CD25- [65]. Wskazuje to na jeszcze jeden – całkowicie fizjologiczny mechanizm regulacji funkcji Treg.

Powyższe obserwacje wskazują, że istnieje możliwość uzyskania *ex vivo* odpowiedniej liczby sprawnych czynnościowo komórek Treg i ich terapeutycznego zastosowania. Postęp badań nad fizjologiczną rolą tych komórek i ich udziałem w procesach patogennych budzi nadzieję, że terapie normalizujące ilościowo i czynnościowo tę subpopulację limfocytów mogą stanowić alternatywę dla stosowanych dotychczas postępowań leczniczych w różnych chorobach.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALBERT MH, ANASETTI C, YU XZ. T regulatory cells as an immunotherapy for transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2006; **6**: 315–324.
- [2] ANDERSSON J, BOASSO A, NILSSON J, ZHANG R, SHIRE NJ, LINDBACK S, SHEARER GM, CHOUGNET CA. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* 2005; **174**: 3143–3147.
- [3] ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, LAZZERI E, MANETTI R, VANINI V, ROMAGNANI P, MAGGI E, ROMAGNANI S. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 2002; **196**: 379–387.
- [4] BACCHETTA R, SARTIRANA C, LEVINGS MK, BORDIGNON C, NARULA S, RONCAROLO MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 2237–2245.
- [5] BAECHEER-ALLAN C, VIGLIETTA V, HAFLER DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol* 2002; **169**: 6210–6217.
- [6] BARATELLI F, LIN Y, ZHU L, YANG SC, HEUZE-VOURC'H N, ZENG G, RECKAMP K, DOHADWALA M, SHARMA S, DUBINETT SM. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* 2005; **175**: 1483–1490.
- [7] BARDOS T, CZIPRI M, VERMES C, FINNEGAN A, MIKECZ K, ZHANG J. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells may not be involved in controlling autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003; **5**: R106–113.
- [8] BARRAT FJ, CUA DJ, BOONSTRA A, RICHARDS DF, CRAIN C, SAVELKOUL HF, DE WAAL-MALEFYT R, COFFMAN RL, HAWRYLOWICZ CM, O'GARRA A. *In vitro* generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; **195**: 603–616.

- [9] BATTAGLIA M, STABILINI A, RONCAROLO MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005; **105**: 4743–4748.
- [10] BELKAID Y, ROUSE BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; **6**: 353–360.
- [11] BERTHELOT JM, MAUGARS Y. Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases (including rheumatoid arthritis). Facts and hypotheses. *Joint Bone Spine* 2004; **71**: 374–380.
- [12] BOPP T, PALMETSHOFER A, SERFLING E, HEIB V, SCHMITT S, RICHTER C, KLEIN M, SCHILD H, SCHMITT E, STASSEN M. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; **201**: 181–187.
- [13] BOYER O, SAADOUN D, ABRIOL J, DODILLE M, PIETTE JC, CACOUB P, KLATZMANN D. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004; **103**: 3428–3430.
- [14] BRINSTER C, SHEVACH EM. Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function. *J Immunol* 2005; **175**: 7332–7340.
- [15] BRUSKO TM, WASSERFALL CH, AGARWAL A, KAPTURCZAK MH, ATKINSON MA. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; **174**: 5181–5186.
- [16] CAO D, MALMSTROM V, BAECHER-ALLAN C, HAFLER D, KLARESKOG L, TROLLMO C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 215–223.
- [17] CAO D, VAN VOLLENHOVEN R, KLARESKOG L, TROLLMO C, MALMSTROM V. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**: R335–346.
- [18] CARAMALHO I, LOPES-CARVALHO T, OSTLER D, ZELENAY S, HAURY M, DEMENGEOT J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003; **197**: 403–411.
- [19] CHEN D, ZHANG N, FU S, SCHROPPEL B, GUO Q, GARIN A, LIRA SA, BROMBERG JS. CD4+ CD25+ regulatory T-cells inhibit the islet innate immune response and promote islet engraftment. *Diabetes* 2006; **55**: 1011–1021.
- [20] CHOI BM, PAE HO, JEONG YR, KIM YM, CHUNG HT. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **327**: 1066–1071.
- [21] CHORAŻY-MASSALSKA M, KONTNY E, MAŚLIŃSKI W. Naturalne komórki regulatorowe (CD4+CD25+). *Post Biol Kom* 2006; **33**: 71–80.
- [22] COSMI L, LIOTTA F, ANGELI R, MAZZINGHI B, SANTARLASCIO V, MANETTI R, LASAGNI L, VANINI V, ROMAGNANI P, MAGGI E, ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S. Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines. *Blood* 2004; **103**: 3117–3121.
- [23] COZZO C, LARKIN J, 3RD, CATON AJ. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; **171**: 5678–5682.
- [24] CRELLIN NK, GARCIA RV, HADISFAR O, ALLAN SE, STEINER TS, LEVINGS MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2005; **175**: 8051–8059.
- [25] CURIEL TJ, COUKOS G, ZOU L, ALVAREZ X, CHENG P, MOTTRAM P, EVDEMON-HOGAN M, CONEJO-GARCIA JR, ZHANG L, BUROW M, ZHU Y, WEI S, KRYCZEK I, DANIEL B, GORDON A, MYERS L, LACKNER A, DISIS ML, KNUTSON KL, CHEN L, ZOU W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; **10**: 942–949.
- [26] DANNULL J, SU Z, RIZZIERI D, YANG BK, COLEMAN D, YANCEY D, ZHANG A, DAHM P, CHAO N, GILBOA E, VIEWEG J. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3623–3633.
- [27] DE KLEER IM, WEDDERBURN LR, TAAMS LS, PATEL A, VARSANI H, KLEIN M, DE JAGER W, PUGAYUNG G, GIANNONI F, RIJKERS G, ALBANI S, KUIS W, PRAKKEN B. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004; **172**: 6435–6443.
- [28] DIECKMANN D, PLOTTNER H, BERCHTOLD S, BERGER T, SCHULER G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; **193**: 1303–1310.

- [29] EHRENSTEIN MR, EVANS JG, SINGH A, MOORE S, WARNES G, ISENBERG DA, MAURI C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *J Exp Med* 2004; **200**: 277–285.
- [30] FALLARINO F, GROHMANN U, HWANG KW, ORABONA C, VACCA C, BIANCHI R, BELLADONNA ML, FIORETTI MC, ALEGRE ML, PUCCETTI P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 1206–1212.
- [31] FINGER EB, BLUESTONE JA. When ligand becomes receptor-tolerance via B7 signaling on DCs. *Nat Immunol* 2002; **3**: 1056–1057.
- [32] FRITZSCHING B, OBERLE N, EBERHARDT N, QUICK S, HAAS J, WILDEMANN B, KRAMMER PH, SURI-PAYER E. In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol* 2005; **175**: 32–36.
- [33] FRITZSCHING B, OBERLE N, PAULY E, GEFFERS R, BUER J, POSCHL J, KRAMMER P, LINDERKAMP O, SURI-PAYER E. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance towards CD95L-mediated cell death. *Blood* 2006 Jul 25 [Epub ahead of print].
- [34] FUJINAMI RS. A tax on luxury: HTLV-I infection of CD4(+)/CD25(+) Tregs. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1144–1146.
- [35] GODFREY WR, GE YG, SPODEN DJ, LEVINE BL, JUNE CH, BLAZAR BR, PORTER SB. *In vitro*-expanded human CD4(+)/CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* 2004; **104**: 453–461.
- [36] GREGG R, SMITH CM, CLARK FJ, DUNNION D, KHAN N, CHAKRAVERTY R, NAYAK L, MOSS PA. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005; **140**: 540–546.
- [37] HEIKKINEN J, MOTTONEN M, ALANEN A, LASSILA O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 2004; **136**: 373–378.
- [38] HOFFMANN P, EDER R, KUNZ-SCHUGHART LA, ANDREESSEN R, EDINGER M. Large-scale *in vitro* expansion of polyclonal human CD4(+)/CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004; **104**: 895–903.
- [39] HOFFMANN P, ERMANN J, EDINGER M, FATHMAN CG, STROBER S. Donor-type CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002; **196**: 389–399.
- [40] JASPER MJ, TREMELLEN KP, ROBERTSON SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod* 2006; **12**: 301–308.
- [41] JIANG S, CAMARA N, LOMBARDI G, LECHLER RI. Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells *ex vivo*. *Blood* 2003; **102**: 2180–2186.
- [42] KOENEN HJ, FASSE E, JOOSTEN I. CD27/CFSE-based *ex vivo* selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells. *J Immunol* 2005; **174**: 7573–7583.
- [43] KOENEN HJ, FASSE E, JOOSTEN I. IL-15 and cognate antigen successfully expand *de novo*-induced human antigen-specific regulatory CD4+ T cells that require antigen-specific activation for suppression. *J Immunol* 2003; **171**: 6431–6441.
- [44] KONTNY E, RUDNICKA W, MAŚLIŃSKI W. Receptory TOLL-podobne: znaczenie fizjologiczne i udział w patogenezie chorób reumatycznych. *Reumatologia* 2004; **42**: 551–566.
- [45] KRETSCHMER K, APOSTOLOU I, HAWIGER D, KHAZAIE K, NUSSENZWEIG MC, VON BOEHMER H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1219–1227.
- [46] KRIEGEL MA, LOHMANN T, GABLER C, BLANK N, KALDEN JR, LORENZ HM. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 2004; **199**: 1285–1291.
- [47] LA CAVA A, VAN KAER L, FU DONG S. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* 2006; **27**: 322–327.
- [48] LAVIE F, GOTTENBERG J-E, ABBED K, GASNAULD J. CD4CD25 regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjogren's syndrom. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: S223.
- [49] LEE JH, WANG LC, LIN YT, YANG YH, LIN DT, CHIANG BL. Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006; **117**: 280–286.
- [50] LEWKOWICZ P, LEWKOWICZ N, TCHÓRZEWSKI H. CD4+CD25+ T regulatory cells in pathophysiology and therapy of immunologic diseases. *Post Hig Med Dosw* 2005; **59**: 371–376.



- [51] LEWKOWICZ P, LEWKOWICZ N, TCHÓRZEWSKI H. CD4+CD25+ T regulatory cells: their physiology and role in modulating immune response. *Post Hig Med Dosw* 2005; **59**: 362–370.
- [52] LIM HW, HILLSAMER P, BANHAM AH, KIM CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; **175**: 4180–4183.
- [53] LIU CY, BATTAGLIA M, LEE SH, SUN QH, ASTER RH, VISENTIN GP. Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells. *J Immunol* 2005; **174**: 2680–2686.
- [54] LIU H, KOMAI-KOMA M, XU D, LIEW FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 7048–7053.
- [55] LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, SZOT GL, LEE MR, ZHU S, GOTTLIEB PA, KAPRANOV P, GINGERAS TR, DE ST GROTH BF, CLAYBERGER C, SOPER DM, ZIEGLER SF, BLUESTONE JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4(+) T reg cells. *J Exp Med* 2006; **203**: 1701–1711.
- [56] LIYANAGE UK, MOORE TT, JOO HG, TANAKA Y, HERRMANN V, DOHERTY G, DREBIN JA, STRASBERG SM, EBERLEIN TJ, GOEDEGEBUURE PS, LINEHAN DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; **169**: 2756–2761.
- [57] MAHIC M, YAQUB S, JOHANSSON CC, TASKEN K, AANDAHL EM. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J Immunol* 2006; **177**: 246–254.
- [58] McDAID J, YAMASHITA K, CHORA A, OLLINGER R, STROM TB, LI XC, BACH FH, SOARES MP. Heme oxygenase-1 modulates the allo-immune response by promoting activation-induced cell death of T cells. *FASEB J* 2005; **19**: 458–460.
- [59] MELLOR AL, MUNN D. Policing pregnancy: Tregs help keep the peace. *Trends Immunol* 2004; **25**: 563–565.
- [60] MIYARA M, AMOURA Z, PARIZOT C, COSTEDOAT-CHALUMEAU N, HAROCHE J. Perturbation of CD4+CD25+++/CD4+CD25++ T cell balance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: S222.
- [61] MONK CR, SPACHIDOU M, ROVIS F, LEUNG E, BOTTO M, LECHLER RI, GARDEN OA. MRL/Mp CD4+,CD25- T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4+,CD25+ regulatory T cells *in vitro*: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 1180–1184.
- [62] MORGAN ME, SUTMULLER RP, WITTEVEEN HJ, VAN DUIVENVOORDE LM, ZANELLI E, MELIIEF CJ, SNIJDERS A, OFFRINGA R, DE VRIES RR, TOES RE. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 1452–1460.
- [63] NELSON BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol* 2004; **172**: 3983–3988.
- [64] OH GS, PAE HO, CHOI BM, CHAE SC, LEE HS, RYU DG, CHUNG HT. 3-Hydroxyanthranilic acid, one of metabolites of tryptophan via indoleamine 2,3-dioxygenase pathway, suppresses inducible nitric oxide synthase expression by enhancing heme oxygenase-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **320**: 1156–1162.
- [65] PACE L, PIOLI C, DORIA G. IL-4 modulation of CD4+CD25+ T regulatory cell-mediated suppression. *J Immunol* 2005; **174**: 7645–7653.
- [66] PAE HO, OH GS, CHOI BM, CHAE SC, CHUNG HT. Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**: 701–705.
- [67] PAE HO, OH GS, CHOI BM, CHAE SC, KIM YM, CHUNG KR, CHUNG HT. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2004; **172**: 4744–4751.
- [68] PASARE C, MEDZHITOV R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; **299**: 1033–1036.
- [69] PENG G, GUO Z, KINIWA Y, VOO KS, PENG W, FU T, WANG DY, LI Y, WANG HY, WANG RF. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005; **309**: 1380–1384.
- [70] POLANCZYK MJ, CARSON BD, SUBRAMANIAN S, AFENTOULIS M, VANDENBARK AA, ZIEGLER SF, OFFNER H. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 2004; **173**: 2227–2230.
- [71] ROSNER I, MAHMUDOV Z, KESSEL A, SLOBODIN G. Active RA patients' increased CD4+CD25+ T cells apoptosis is reduced by Infliximab. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: S108.

- [72] RUPRECHT CR, GATTORNO M, FERLITO F, GREGORIO A, MARTINI A, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med* 2005; **201**: 1793–1803.
- [73] RYBA M, MYŚLIWSKA J. Biologia naturalnych limfocytów regulatorowych CD4+CD25+. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 427–436.
- [74] RYTER SW, OTTERBEIN LE, MORSE D, CHOI AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 2002; **234–235**: 249–263.
- [75] SAKAGUCHI S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J Exp Med* 2003; **197**: 397–401.
- [76] SEDDIKI N, SANTNER-NANAN B, MARTINSON J, ZAUNDERS J, SASSON S, LANDAY A, SOLOMON M, SELBY W, ALEXANDER SI, NANAN R, KELLEHER A, FAZEKAS DE ST GROTH B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; **203**: 1693–1700.
- [77] SHARMA S, YANG SC, ZHU L, RECKAMP K, GARDNER B, BARATELLI F, HUANG M, BATRA RK, DUBINETT SM. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 2005; **65**: 5211–5220.
- [78] SKAPENKO A, KALDEN JR, LIPSKY PE, SCHULZE-KOOPS H. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol* 2005; **175**: 6107–6116.
- [79] SOMERSET DA, ZHENG Y, KILBY MD, SANSOM DM, DRAYSON MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004; **112**: 38–43.
- [80] SUTMULLER RP, DEN BROK MH, KRAMER M, BENNINK EJ, TOONEN LW, KULLBERG BJ, JOOSTEN LA, AKIRA S, NETEA MG, ADEMA GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006; **116**: 485–494.
- [81] TARBELL KV, YAMAZAKI S, OLSON K, TOY P, STEINMAN RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004; **199**: 1467–1477.
- [82] TAYLOR PA, PANOSKALTSIS-MORTARI A, SWEDIN JM, LUCAS PJ, GRESS RE, LEVINE BL, JUNE CH, SERODY JS, BLAZAR BR. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 2004; **104**: 3804–3812.
- [83] TEITELBAUM SL. Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 16711–16712.
- [84] VALENCIA X, STEPHENS G, GOLDBACH-MANSKY R, WILSON M, SHEVACH EM, LIPSKY PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006; **108**: 253–261.
- [85] VALZASINA B, PICONESE S, GUIDUCCI C, COLOMBO MP. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res* 2006; **66**: 4488–4495.
- [86] VAN AMELSFORT J, NOORDEGRAAF M, BIJLSMA J, TAAMS LS. Influence of the inflammatory milieu on the suppressive function of CD4+CD25+ T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: S526.
- [87] VAN AMELSFORT JM, JACOBS KM, BIJLSMA JW, LAFEBER FP, TAAMS LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 2775–2785.
- [88] VIGLIETTA V, BAECHEMER-ALLAN C, WEINER HL, HAFNER DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; **199**: 971–979.
- [89] WALKER LS, CHODOS A, EGGENA M, DOOMS H, ABBAS AK. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells *in vivo*. *J Exp Med* 2003; **198**: 249–258.
- [90] WOO EY, CHU CS, GOLETZ TJ, SCHLIENGER K, YEH H, COUKOS G, RUBIN SC, KAISER LR, JUNE CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 4766–4772.
- [91] YANG XH, YAMAGIWA S, ICHIDA T, MATSUDA Y, SUGAHARA S, WATANABE H, SATO Y, ABO T, HORWITZ DA, AOYAGI Y. Increase of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; **45**: 254–262.

- [92] YVON ES, VIGOUROUX S, ROUSSEAU RF, BIAGI E, AMROLIA P, DOTTI G, WAGNER HJ, BRENNER MK. Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood* 2003; **102**: 3815–3821.
- [93] ZHAO DM, THORNTON AM, DIPAOLO RJ, SHEVACH EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006; **107**: 3925–3932.
- [94] ZHENG Y, MANZOTTI CN, LIU M, BURKE F, MEAD KI, SANSOM DM. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol* 2004; **172**: 2778–2784.
- [95] ŻYLICZ M, BOCIAN K, KORCZAK-KOWALSKA G. Regulatory cells: their development, mechanisms and effects of action, and their potential use in transplantation. *Post Hig Med Dosw* 2005; **59**: 160–171.

*Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 17.09. 2006 r.*

*Przyjęto: 27.10. 2006 r.*

*ul..Spartańska 1, 02-637 Warszawa,*

*e-mail: zpatiir@warman.com.pl*

*e-mail: MChorazy@ir.ids.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 procesy 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.

Właśnie ukazał się **SŁOWNIK BIOLOGII KOMÓRKI** (red. J. Kawiak, H. Krzanowska, B. Płytycz, M. Zabel; Polska Akademia Umiejętności, Kraków 2005). Został przygotowany przez licznych Autorów, skupionych wokół Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.

Najkorzystniej można nabyć **Słownik** wprost w Dziale Wydawnictw PAU, wysyłając list lub e-mail na adres:

**Dział Wydawnictw PAU, ul. Sławkowska 17, 31-016 Kraków**  
**e-mail: [wydawnictwo@pau.krakow.pl](mailto:wydawnictwo@pau.krakow.pl)**

Wydawnictwo wysyła fakturę z numerem konta, a po otrzymaniu przelewu przesyła pod podany adres egzemplarz książki wraz z płytą CD.

Książka, wraz z wersją elektroniczną, kupowana wprost u Wydawcy (w **Dziale Wydawnictw Polskiej Akademii Umiejętności**) kosztuje wraz z płytą CD **55,- zł**.

Najkorzystniej jest dokonać zakupu dla kilku osób łącznie (lub dla biblioteki). Przy zakupie od 3 egzemplarzy wzywa Wydawnictwo stosuje 10% ulgi i pokrywa koszty wysyłki, natomiast przy odbiorze książek w Krakowie można uzyskać 15-proc. ulgę.

## 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) 5693830, fax. (022) 5693712, e-mail [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)**

W „Postęпах Biologii Komórki” publikowane są artykuły omawiające najnowsze osiągnięcia z zakresu biologii komórki. Zeszyty są przeznaczone dla studentów i nauczycieli, pracowników naukowych uczelni i instytutów naukowych. Wydawanie czasopisma jest możliwe dzięki wsparciu finansowemu Ministerstwa Edukacji i Nauki.

**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. dla 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

---

### ZAMOWIENIE

.....dnia.....

nazwa i adres zamawiającego

**Fundacja Biologii Komórki  
i Biologii Molekularnej  
ul. Marymoncka 99  
01-813 WARSZAWA**

L. Dz.....

Zamawiam/y .....egz./kmpł ....., „Postępow Biologii Komórki”.  
Kwotę .....złotych (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

### KOMITET ORGANIZACYJNY

#### XXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów

uprzejmie informuje o organizowanym w dniach 6–9 września 2007 roku w Warszawie XXII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów.

*Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Warzocha  
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego  
XXII Zjazdu PTHiT*

#### **Adres Komitetu:**

*Instytut Hematologii i Transfuzjologii  
ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa, tel/fax (022) 849-85-07*

---

## KOMUNIKAT

### Zarządów Oddziałów Warszawskich Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki

#### **Szanowni Państwo,**

Celem większej integracji warszawskiego środowiska naukowego biologii eksperymentalnej proponujemy organizowanie wspólnych **mini-sympozjów**. Planujemy organizować je w soboty, 3–4 razy w roku akademickim 2006/2007.

Prosimy o zgłaszanie sugestii tematycznych i/lub chęci wygłoszenia wykładów. Liczymy na współpracę z Państwa strony.

Z pozdrowieniami, w imieniu Zarządu:

*Hanna Fabczak PTBK  
email <ptbk@nencki.gov.pl>*

*Barbara Zablocka, PTBiochem  
<zablocka@cmdik.pan.pl>*

### **Polskie Towarzystwo Biologii Komórki Oddział Warszawski**

Prezes: prof. dr hab. Jerzy Moraczewski – Uniwersytet Warszawski  
Vice-prezes: dr hab. Anna Wasik – Instytut Biologii Doświadczalnej  
Skarbnik: dr hab. Olga Olszowska – Akademia Medyczna  
Sekretarz: dr hab. Hanna Fabczak – Instytut Biologii Doświadczalnej

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
faks (22)822 53 42, tel.(22) 58 92 317, e-mail: PTBK@nencki.gov.pl



## Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w programie Word. Rysunki muszą być umieszczone osobno na płycie CD. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, JPG), albo pliki z Corela, wersja 11,0 lub wcześniejsza. 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 umieszczenie podziałki wskazującej powiększenie obiektów, a nie podawanie powiększeń w podpisach, gdyż zdjęcia ulegają zmniejszeniu do formatu B<sub>5</sub>.

Prosimy Autorów o podawanie adresów e-mail.

### Cennik dla Autorów w 2006 r.

	odbitki prac			pdf	barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	–	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	100,00	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 2007 pod adresem:  
 FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. (022) 5693830, fax. (022) 5693712,  
 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 2007
dla instytucji (bibliotek) wynosi	150 zł
dla odbiorców indywidualnych	50 zł

### *Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2007*

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of  
 POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,  
 tel. (022) 5693830, fax. (022) 5693712, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,  
 IV O/Warszawa, No 20124010531111000004409533.

Price per year 25 dollars USA or 21 euro.



## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązują 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 konieczne z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi); 2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji); 3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki powinny być przysłane na płycie CD jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe (3 do 10 słów) zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony nie pisząc znaku przeniesienia (-) rzdzielającego wyraz. 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 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 konieczne 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

Treść pracy nie była uprzednio publikowana,

i rycin

**tak nie**

nie została wysłana do innej redakcji

**tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę

**tak nie**

Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na płycie CD

Jest zgoda osób, których informacje nie-

z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego

publikowane są zamieszczone w tekście

**tak nie**

z komputera IBM

**tak nie**

Odpowiadam za całość pracy opisaną 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 Zeszytcie	589
PIETRYCZUK A., CZERPAK R.: Występowanie, biosynteza i aktywność biologiczna kwasu traumatynowego u roślin Occurrence, biosynthesis and biological activity of traumatic acid in plants	591
WACHOWICZ B., OLAS B., RYWANIAK J.: Markery apoptozy w płytkach krwi Apoptosis markers in blood platelets	603
STARSKA K., ŁUKOMSKI M.: Regulacja cyklu komórkowego, procesu apoptozy, wydzielania cytokin i cząsteczek adhezyjnych w limfocytach T i innych komórkach krwi obwodowej oraz komórkach nowotworowych w mechanizmie aktywacji <i>Toll-like receptors</i> (TLRs) i rodziny cząsteczek transkrypcyjnego czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B Regulation of cell-cycle process, cell apoptosis, cytokines and adhesion molecules production in lymphocytes T and other blood cells and neoplasm cells in mechanism of Toll-like receptors and transcription nuclear factor NF- $\kappa$ B family activation	621
SOŃDKA Z., TRETYN A., SZELIGA J., JACKOWSKI M.: Udział białek zawierających powtórzenia bogate w leucynę (LRR) w molekularnych mechanizmach odporności wrodzonej roślin i zwierząt Involvement of leucine rich repeats (LRR) domain containing proteins in molecular mechanisms of innate immunity of plants and animals	635
MIGOCKA M.: Rola pierwotnych pomp metalowych ( $P_{IB}$ -ATPaz) w utrzymywaniu homeostazy metali ciężkich w komórkach roślinnych The role of primary metal pumps ( $P_{IB}$ -ATPases) in the maintaining of heavy metals homeostasis in plant cells	657
BUŻAŃSKA L.: Neuralne komórki macierzyste z ludzkiej krwi pępowinowej – charakterystyka immunocytochemiczna, fizjologiczna i molekularna Neural stem cells from human cord blood – immunocytochemical physiological and molecular analysis	667
LAPKA A., GO•DZIALSKA A., JAŚKIEWICZ J.: Rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w nowotworach piersi, ze szczególnym uwzględnieniem roli żelatynazy A oraz żelatynazy B The role of matrix metalloproteinases in breast cancer, with particular role of gelatinase A and gelatinase B	683
ŚLIWIŃSKI T., BŁASIAK J.: Naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów w komórkach ssaków Nucleotide excision repair in mammalian cells	697
KOZŁOWSKI J., STYRNA J.: Wielkość genomów jądrowych i komórek u zwierząt: mechanizmy różnicowania oraz konsekwencje fizjologiczne i ekologiczne Nuclear genome size and cell size in animals: mechanisms of differentiation, Physiological and ecological consequences	721
OLSZEWSKA M. J., SAKOWICZ T.: Ewolucja rozmiarów genomów jądrowych u roślin okrytozalążkowych Evolution of nuclear genome size in angiosperm plants	737
LITWINIEC A., GRZANKA A., STĘPIEŃ A.: Zaburzenia funkcji lamin a patofizjologia laminopatii Affections of lamins' functions and the pathophysiology of laminopathies	753
CHORAŻY-MASSALSKA M., KONTNY E., MAŚLIŃSKI W.: Kontrola odpowiedzi immunologicznej przez naturalne (CD4+CD25+) komórki regulatorowe The immune response control by natural (CD4+CD25+) regulatory T cells	771
Informacje i Komunikaty	791
Wskazówki i warunki prenumeraty	795