

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 27, ISSUE 4/2000
(465-660)

Postępy Biologii Komórki

Advances in Cell Biology

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

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

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

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry, immunocytochemistry, hybrydocytochemistry, cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

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

Wykaz recenzentów tomu 27 PBK z 2000 r. umieszczono na następnej stronie tego zeszyciu.

Referees of the volume 27 2000 is on following page.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology
address: www.mol.uj.edu.pl/pbk

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

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

W tym zeszycie „Postępów Biologii Komórki

- Regulacja cyklu komórkowego jest omawiana w dwu publikacjach obecnego zeszytu „Postępów”:
Na stronie 569 Czytelnik znajdzie relację z konferencji poświęconych temu zagadnieniu w związku z 30-leciem odkrycia czynnika cytoplazmatycznego odpowiedzialnego za rozpoczęcie fazy M cyklu. Czynnikiem ten o nazwie MPF (*Maturation Promoting Factor*) wykryli w oocytach żaby Masui i Market w 1971 roku. Wykazano, że MPF jest kompleksem dwóch białek: kinazy białkowej zależnej od cykliny – CDK (*Cycline-Dependent Kinase*) oraz cykliny – jednostki regulatorowej.
Na stronie 481 można znaleźć pracę o białku p27, jednym z inhibitorów kinaz zależnych od cyklin. Białko to nie tylko kontroluje cykl komórkowy przez regulację aktywności kompleksów CDK i cyklin, ale uczestniczy również w indukcji apoptozy. Ten ostatni wpływ nie jest dobrze poznany, ale budzi zainteresowanie wobec zaburzenia ekspresji p27 w rozrostach nowotworowych.
- Na komórkach nowotworów pochodzenia neuroektodermalnego, z układu krwiotwórczego i mięsaków z mięśni poprzecznie prążkowanych występuje białko określane jako CD56 albo NCAM. Jest to białko 140 kD nerwowej cząsteczki adhezyjnej, której budowę, biosyntezę i prawdopodobne funkcje opisano na stronie 599.
- Chcemy zwrócić uwagę Czytelników na publikowane w internecie streszczenia artykułów ukazujących się w „Postępach Biologii Komórki” pod adresem:
www.mol.uj.edu.pl/pbk
Streszczenia są w języku polskim i angielskim. Nie jest to może jeszcze prowadzone bardzo sprawnie, ale czynimy starania, aby ten sposób przekazywania informacji poprawić.

Wykaz recenzentów z tomu 27, 2000*
Referees of the volume 27 2000

doc. dr hab. M. Balińska
prof. dr hab. S. Biliński,
prof. dr hab. M. Drózdź,
prof. dr hab. B. Grzelakowska-Sztabert
doc. dr hab. A. Guzdek
doc. dr hab. B. Kamińska,
prof. dr hab. J. Kawiak,
prof. dr hab. W. Kilariski,
prof. dr hab. A. K. Kononowicz
prof. dr hab. W. Korohoda
prof. dr hab. M. Kossut
prof. dr hab. H. Krzanowska
prof. dr hab. P. Laidler
prof. dr hab. J. Legocka
prof. dr hab. S. Lewak
prof. dr hab. J. Limon

prof. dr hab. M. J. Olszewska,
prof. dr hab. Z. Osuchowska
prof. dr hab. B. Płytycz
prof. dr hab. J. Rafałowska
doc. dr hab. J. A. Siedlecki
prof. dr hab. P. Stępień,
prof. dr hab. M. Stryjecka-Zimmer
doc. dr hab. J. Styrna
doc. dr hab. A. Szewczyk
doc. dr hab. L. Witalińska
prof. dr hab. M. Zabel,
prof. dr hab. T. Zalewski
prof. dr hab. J. Żeromski

*Lista ta będzie uzupełniona w zeszycie PBK 1/2001.

ROLA WAPNIOWEGO SYSTEMU PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW W REGULACJI WZROSTU ŁAGIEWEK PYŁKOWYCH

ROLE OF CALCIUM SIGNALLING IN THE POLLEN TUBE GROWTH REGULATION

Elżbieta BEDNARSKA¹, Marta LENARTOWSKA²

¹Zakład Biologii Eksperymentalnej, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska WSP w Słupsku, ²Pracownia Biologii Rozwoju, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, UMK w Toruniu

Streszczenie: Wzrost łagiewki pyłkowej roślin okrytonasiennych stanowi ważny model badań nad funkcjonowaniem systemu przekazywania informacji u roślin. W ciągu ostatniego 10-lecia hodowane w warunkach *in vitro* łagiewki pyłkowe były szeroko wykorzystywane w badaniach biochemicznych i cytofizjologicznych. Badania skoncentrowane były na poznaniu molekularnych zjawisk włączających jony wapniowe w mechanizmy odpowiedzialne za regulację wzrostu i orientacji łagiewki pyłkowej. W obecnej pracy przedstawione zostały wyniki badań nad regulacją homeostazy wapniowej w łagiewkach pyłkowych, funkcjonowaniem fosfatydylinozytowego szlaku transdukcji sygnałów podczas jej wzrostu oraz rolą cytosolowego poziomu wolnych Ca^{2+} w reorientacji kierunku wzrostu łagiewek.
(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 467–479)

Słowa kluczowe: transdukcja sygnałów, jony wapnia, łagiewka pyłkowa, ukierunkowanie wierzchołkowego wzrostu

Summary: Angiosperm pollen tube growth is recognised as an important model for studies of signal transduction in plants. In the past 10 years this field of research has expanded significantly. Recent studies has been focused on the molecular events involving calcium ions in mechanisms of the pollen tube growth and orientation. Important results on the biochemical and physiological aspects of the molecular regulation of these processes have been reported. The following review attempts to cover these issues. The aim of this paper is to present a general overview of the calcium homeostasis regulation in developing pollen tube, the involvement of the phosphatidylinositol signal transduction pathway during pollen tube growth and the signaling role for cytosolic free Ca^{2+} in the tube reorientation.
(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 467–479)

Key words: signal transduction, calcium ions, pollen tube, orientation of pollen tube tip growth

1. WSTĘP

Zarówno u roślin, jak i u zwierząt przekazywanie sygnałów w komórce odbywa się drogą fosfatydyloinozytolową z udziałem Ca^{2+} jako wtórnego przekaźnika informacji [3, 7, 50, 51, 52, 60]. Modelem pozwalającym na prowadzenie szerokiego spektrum badań nad funkcjonowaniem tego systemu u roślin są kielkujące ziarna pyłkowe i rosnące łagiewki pyłkowe roślin kwiatowych. Wynika to w głównej mierze z tego, iż:

(1) ziarna pyłkowe stosunkowo łatwo kielkują w warunkach *in vitro*, stanowiąc w ten sposób dogodny model do badań eksperymentalnych,

(2) w modelu tym mamy do czynienia ze wzrostem tylko jednej komórki, zatem jej wzrost może być łatwo monitorowany,

(3) rosnąca łagiewka pyłkowa charakteryzuje się spolaryzowanym i bardzo szybkim wzrostem; jak obliczono u *Lilium* mająca ok. $16 \mu\text{m}$ średnicy łagiewka pyłkowa rośnie w tempie ok. $10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, co wymaga produkcji $1,6 \mu\text{m}^3$ ściany na sekundę [21].

Wiadomo również, że u roślin kwiatowych występuje zjawisko samoniezgodności, którego funkcjonowanie wymaga wymiany informacji między pyłkiem a słupek [20, 24, 31]. Problematyka badawcza, w której wykorzystywane są łagiewki pyłkowe, jest skierowana na poznanie funkcjonowania elementów zaangażowanych w wapieniowy system przekazywania informacji u roślin, a także na wyjaśnienie mechanizmów reorientacji polarnego wzrostu komórki. W warunkach *in vivo* łagiewka pyłkowa musi bowiem dostosować kierunek swego wzrostu względem miejsca lokalizacji mikropyle załączka, przez który wrasta do woreczka załączkowego.

2. UDZIAŁ JONÓW Ca^{2+} W KIELKOWANIU ZIAREN PYŁKOWYCH I WZROŚCIE ŁAGIEWEK PYŁKOWYCH

Trwające od lat 60. badania wykazały, że jony wapieniowe odgrywają kluczową rolę w regulacji kielkowania ziaren pyłkowych i wzrostu łagiewek pyłkowych [18, 19, 35, 59]. W charakteryzujących się polarnym wzrostem łagiewkach obecny jest specyficzny gradient Ca^{2+} – najwyższy poziom tych jonów występuje w wierzchołku łagiewki i obniża się w kierunku jej podstawy (ang. *tip-to-base*). Stabilność gradientu Ca^{2+} warunkuje prawidłowy rozwój łagiewki pyłkowej. W wyniku jego eksperymentalnego zakłócenia, np. w środowisku buforów chelatujących Ca^{2+} [44], zastosowania inhibitorów kanałów wapieniowych [4, 36, 37] i czynników mobilizujących cytoplazmatyczne rezerwy Ca^{2+} [15], następują zaburzenia wierzchołkowego wzrostu łagiewki pyłkowej aż do jego całkowitego zahamowania.

Stężenie wolnych Ca^{2+} w łagiewkach pyłkowych *Lilium longiflorum* waha się od około 3 μM w szczytowej części wierzchołka do około 0,5 μM w odległości 5 μm od niego i tylko 0,2 μM 30 μm poniżej szczytu łagiewki [45]. Poziom $[\text{Ca}^{2+}]_c$ w wierzchołku rosnącej łagiewki nie jest stały. U *L. longiflorum* rejestrowano szybkie oscylacje stężenia Ca^{2+} , których czas w zależności od zastosowanej metody pomiaru $[\text{Ca}^{2+}]_c$ określono jako ok. 40-sekundowy [36] lub 23-sekundowy [45]. Sugeruje się, że zjawisko to jest efektem krótkotrwałej, podwyższonej aktywacji kanałów wapniowych w plazmolemie szczytowej części łagiewki [45] i/lub dostępu wolnych jonów Ca^{2+} do błony komórkowej [21, 25]. Szybkie oscylacje poziomu Ca^{2+} w łagiewce skorelowane są z tempem jej wzrostu – podwyższaniu poziomu Ca^{2+} towarzyszy pulsowy wzrost wierzchołka łagiewki [21, 36]. Podczas gdy zmiany aktywności kanałów wapniowych mogą regulować transport Ca^{2+} do cytosolu, zmiany w strukturze ściany komórkowej na rosnącym wierzchołku łagiewki mogą być odpowiedzialne za dostępność tych jonów do jej plazmolemy. Wydzielany przez pęcherzyki nośnikowe aparatu Golgiego materiał ścianowy zawiera głównie estryfikowane pektyny [23, 25, 27], które nie wiążą jonów Ca^{2+} [10]. Obecne w środowisku wzrostu łagiewki Ca^{2+} bez przeszkód docierają do plazmolemy i mogą być pobierane do cytoplazmy. Estryfikowane pektyny jednakże bardzo szybko ulegają procesowi demetylacji [23, 25], co prowadzi do odsłonięcia grup karboksylowych kwasu poligalakturnonowego. Ujemnie naładowane grupy COO^- wiążą wolne jony wapniowe [10], co z jednej strony prowadzi do usztywnienia ściany łagiewki pyłkowej, z drugiej zaś – może blokować dostęp Ca^{2+} do błony komórkowej. Efektem tego zjawiska jest ograniczenie pobierania tych jonów do cytoplazmy łagiewki. Ponowny wzrost pobierania pojawia się w momencie fuzji nowej porcji pęcherzyków dostarczających do ściany komórkowej estryfikowane pektyny i/lub wbudowujących do plazmolemy białka kanałowe.

2.1. Regulacja homeostazy $[\text{Ca}^{2+}]_c$

Homeostaza wapniowa w komórce utrzymywana jest dzięki funkcjonowaniu kanałów oraz pomp wapniowych [7, 9]. Badania łagiewek pyłkowych ujawniły, że ich plazmolema wyposażona jest w potencjało-zależne [4, 14, 33] i aktywowane naprężeniem błony (ang. *stretch-activated*) kanały wapniowe [34, 44]. Zarówno zastosowanie inhibitorów napięciowo-zależnych kanałów wapniowych [4], jak i działanie pola elektrycznego [33] powodowało zmiany poziomu pobierania egzogenego wapnia. Kanały wapniowe zlokalizowane są na szczycie wierzchołka wzrostu łagiewki pyłkowej i są aktywne tylko podczas jej wzrostu. Uważa się, że białka kanałowe przenoszone są w błonach pęcherzyków Golgiego i wbudowywane do plazmolemy w procesie egzocytozy [45]. Po ich włączeniu do błony komórkowej następuje gwałtowne nasilenie aktywności kanałów – tempo pobierania egzogenych Ca^{2+} osiąga najwyższy poziom. Powierzchnia pobierania Ca^{2+} przez plazmolemę

może być ograniczona do tzw. „łatki”, której średnica nie przekracza 2,5 μm . Od tego miejsca Ca^{2+} dyfundują w głąb cytoplazmy łagiewki. Fuzja nowej porcji pęcherzyków z plazmolemą powoduje odsunięcie „starszych” fragmentów błon od szczytu łagiewki i inaktywację wcześniej wbudowanych kanałów. Dynamikę pobierania Ca^{2+} określono u *Nicotiana* na ok. 4 $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [14], natomiast u *Lilium* na około 1,4 do 14 $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ w zależności od stadium rozwojowego łagiewki pyłkowej [44]. Utrzymanie odpowiedniego potencjału błonowego w wierzchołkowej części łagiewki sugeruje, iż procesowi temu winno towarzyszyć pobieranie anionów, które równoważą dodatni ładunek Ca^{2+} [14].

Precyzyjna regulacja gradientu wapnia w cytosolu łagiewki wskazuje, iż w komórce tej obok kanałów wapniowych muszą funkcjonować mechanizmy usuwania Ca^{2+} poza plazmolemę lub ich gromadzenia w organellach cytoplazmatycznych. Obydwa te procesy wymagają aktywnego, energo-zależnego transportu – pompy wapniowej i/lub wymiennicy jonowych. W błonie komórek roślinnych najważniejszą pompą jonową jest H^+ -ATPaza typu P, dla której optimum pH wynosi 6,8. Badania immunocytochemiczne u *Lilium* wykazały, że ten typ ATPazy występuje w plazmolemie kiełkujących ziaren pyłkowych. Poziom tego enzymu w błonie łagiewki pyłkowej w późniejszych etapach wzrostu był zdecydowanie niższy [42]. Metodami cytochemicznymi ujawniono, że obecna w błonie łagiewki pyłkowej ATPaza może używać jako kosubstratów K^+ , Mg^{2+} i Ca^{2+} [5, 14]. Występowanie Ca^{2+} -ATPazy w błonach organelli magazynujących wapń w rosnących łagiewkach pyłkowych nie jest ostatecznie udokumentowane. Wiadomo, że w tonoplaście funkcjonuje zarówno H^+ -ATPaza typu V, jak i Ca^{2+} -ATPaza [30]. W łagiewkach pyłkowych aktywność ATPazy zlokalizowano w tonoplaście, błonach *P-particles* i w siateczce śródplazmatycznej [5, 14]. Badania prowadzono głównie metodami cytochemicznymi, zatem trudno jednoznacznie stwierdzić, jakiego typu aktywność ATPazy wykrywano. Zarówno u *Agapanthus umbellatus* i *Ophrys lutea* [14] jak i u *Vicia faba* [5] zlokalizowano ATPazy, które mogą używać Ca^{2+} jako substratu. Obecność zależnej od wapnia ATPazy w tonoplaście i błonach ER sugeruje, że organelle te mogą uczestniczyć w regulacji poziomu wapnia. Jak do tej pory brak jest na to bezpośrednich dowodów, choć bierze się pod uwagę możliwość udziału obydwu tych przedziałów komórkowych w magazynowaniu Ca^{2+} .

3. ROLA Ca^{2+} W REORIENTACJI WZROSTU ŁAGIEWEK PYŁKOWYCH

Badania ostatnich lat dostarczyły przekonujących dowodów, że lokalne zmiany poziomu wapnia w cytosolu wierzchołka łagiewki odpowiedzialne są za reorientację kierunku jej wzrostu [32, 34]. Stosując jonoforetyczne mikroiniekcje związków

wpływających na poziom $[Ca^{2+}]_c$ w określonych obszarach wierzchołka łagiewki *Agapanthus umbellatus* udokumentowano, że rośnie ona w kierunku, który wyznacza podwyższony poziom cytosolowego Ca^{2+} [34]. Zarówno asymetryczne podwyższenie $[Ca^{2+}]_c$ uzyskane drogą mikroiniekcji jonoforu A23187, jak i lokalne obniżenie poziomu tych jonów za pomocą inhibitora kanałów wapniowych $GdCl_2$ prowadziło do skierowania się wierzchołka wzrostu łagiewki w stronę wyznaczoną przez wyższy poziom $[Ca^{2+}]_c$. Podobny efekt może być generowany asymetryczną aktywacją kanałów wapniowych w odpowiedzi na zewnętrzne pole elektryczne depolaryzujące błony i/lub zmiany naprężenia błony [33]. Bierze się też pod uwagę transdukcję sygnałów, których źródłem są cząsteczki występujące w szlaku transmisyjnym szczyki słupka.

Przejęciowy wzrost stężenia $[Ca^{2+}]_c$ jest istotnym elementem reakcji odpowiedzi w samoniezgodności gametofitowej u *Papaver rhoeas* [57]. Traktowanie łagiewek pyłkowych niezgodnymi białkami S powodowało wzrost stężenia wolnych Ca^{2+} i Ca^{2+} -zależną fosforylację niektórych białek. Rezultatem była aktywacja ekspresji genów specyficznych dla odpowiedzi samoniezgodności i ostatecznie zahamowanie wzrostu łagiewek. Podobnego efektu nie obserwowano po działaniu zgodnymi białkami S lub białkami niezgodnymi, ale wcześniej inaktywowanymi poprzez denaturację. Badania te wskazują, że Ca^{2+} w łagiewkach pyłkowych pełni rolę sygnalizacyjną.

3.1. Funkcjonowanie fosfatydyloinozytoloowego szlaku transdukcji sygnałów

Zakładając, że w warunkach *in vivo* szlak transmisyjny słupka oraz załączek są źródłem sygnałów odbieranych przez łagiewki pyłkowe, w komórkach tych powinien funkcjonować sprawny system transdukcji informacji. Badania ostatnich lat, prowadzone na układach modelowych *in vitro*, koncentrowały się na poznaniu szlaków metabolicznych uczestniczących w komórkowym przekazywaniu sygnałów. Uzyskane wyniki dostarczyły dowodów, że lokalne zmiany poziomu Ca^{2+} w łagiewce pyłkowej oraz kierunek jej wzrostu regulowane są w drodze fosfatydyloinozytoloowej.

Białka G. W 1996 roku Lin i wsp. [28] metodą hybrydyzacji kwasów nukleinowych wykazali, że w pyłku grochu ma miejsce transkrypcja genu kodującego białko Rop1 należące do rodziny Rho-GTPazy. Rho GTPazy u ssaków i drożdży regulują aktywność kinaz białkowych [41] oraz kontrolują różne procesy komórkowe zależne od organizacji i funkcjonowania cytoszkieletu, takie jak np. przepływ błon i cykl komórkowy [49]. Wykryte u grochu Rop GTPazy tworzą nową, nieznaną u grzybów i ssaków podrodzinę białek Rho. Badając różne tkanki grochu ujawniono, że białka Rop występują w pylnikach oraz słupkach, ale dopiero po ich zapyleniu. Wskazuje to, iż jego pojawienie się w słupku pozostaje w ścisłej zależności z zapyleniem i wzrostem łagiewek pyłkowych. Badania immunocytochemiczne po-

twierdziły występowanie białka Rop w rosnących *in vitro* łagiewkach pyłkowych. Najwyższy poziom białka obecny był w regionie kortykalnym wierzchołka i zmniejszał się w kierunku podstawy łagiewki. Białko Rop występuje zarówno w cytosolu, jak i pozostaje silnie związane z błonami. Sugeruje się, że w łagiewkach pyłkowych, podobnie jak w przypadku białek Rho u ssaków [17] lokalizacja białka Rop zależy od izoprenylacji przez geranylgeranyl transferazę [28]. Po izoprenylacji i związaniu GTP aktywne białko wiąże się z błoną, gdzie uczestniczy w regulacji organizacji cytoszkieletu. Nieaktywne białko Rop pozostaje na terenie cytosolu.

Wiążące GTP białka Rho pełnią ważną rolę w kontroli wzrostu łagiewki pyłkowej. Dwa podstawowe procesy polarnego wzrostu łagiewki, tj. ukierunkowany ruch cytoplazmy oraz elongacja wierzchołka, są regulowane niezależnymi drogami przy udziale różnych białek G z rodziny Rho GTPazy [29]. Podanie do wierzchołka łagiewki pyłkowej przeciwciała anti-Rop GTPazy powodowało bardzo szybkie zahamowanie jej wzrostu. Jednakże zablokowanie tego jednego białka G nie miało żadnego wpływu na ruch cytoplazmy, który nadal odbywał się bez zakłóceń. Dopiero mikroiniekcja bakteryjnej toksyny C3, która hamuje różne typy Rho GTPazy, prowadziła do zatrzymania zarówno przepływu cytoplazmy, jak i elongacji łagiewki. Badania te wskazują, że Rop GTPaza bierze udział tylko w zależnym od Ca^{2+} zakotwiczeniu i fuzji pęcherzyków z plazmolemą wierzchołka łagiewki pyłkowej. Inne białka z rodziny Rho GTPazy (wrażliwe na toksynę C3) regulują natomiast zależny od funkcjonowania cytoszkieletu aktywny ruch cytoplazmy [29].

PI-specyficzna fosfolipaza C. Jednym z najważniejszych białek aktywowanych przez białko G jest fosfolipaza C, enzym rozszczepiający PIP_2 na IP_3 i diacylglicerol. Obecność tego enzymu stwierdzono we frakcji mikrosomalnej łagiewek pyłkowych *Papaver rhoeas* [15]. Inkubacja frakcji mikrosomalnej łagiewek w obecności znakowanego trytem PIP_2 prowadziła do wzrostu ilości radioaktywnego IP_3 w roztworze. Badany enzym był wrażliwy na stężenie Ca^{2+} . W stężeniu 10^{-7} M Ca^{2+} , tj. odpowiadającym niepobudzonej komórce, jego aktywność była pięciokrotnie niższa niż w stężeniu 10^{-5} M, czyli w warunkach pobudzenia [15]. Ponadto wykazano, że podanie neomycyny prowadzi do obniżenia aktywności fosfolipazy C we frakcji mikrosomalnej łagiewek pyłkowych. Istnieją dowody, że inhibitor ten, który u zwierząt częściowo hamuje rianodinowe receptory IP_3 [56], u roślin w ciągu kilku sekund hamuje aktywność PLC [11] i produkcję IP_3 [47]. Informacje te wskazują, że w łagiewkach pyłkowych funkcjonuje indukowane przez IP_3 uwalnianie Ca^{2+} .

Inozytolo(1,4,5)trifosforan (IP_3). Dowodów na IP_3 -zależny wzrost stężenia Ca^{2+} w łagiewce pyłkowej dostarczyły badania u *Papaver rhoeas* [15]. Mikroiniekcja mieszaniny markera $[Ca^{2+}]_c$ Calcium-Green z nitrofenolowym estrem IP_3 umożliwiła kontrolowane (pod wpływem promieni UV) uwalnianie IP_3 do cytoplazmy łagiewki pyłkowej. Pozwala to na precyzyjne rejestrowanie zmian poziomu $[Ca^{2+}]_c$ pod wpływem działania egzogenego IP_3 . Prowadzone w warunkach *in vitro* badania ujawniły, że fotoliza estru IP_3 prowadzi do podniesienia cytosolowego Ca^{2+} . Poziom

IP₃ inicjujący wzrost Ca²⁺ wynosił ok. 1 μM. Przemieszczająca się w kierunku wierzchołka fala podwyższonego poziomu Ca²⁺ po 6–7 minutach prowadziła do zatrzymania elongacji łągiełek pyłkowych. Podobny efekt obserwowano po działaniu mastoparyny, która stymuluje hydrolizę PIP₂ i produkcję IP₃ [12, 13]. Podwyższenie poziomu endogennego IP₃ powodowało pojawienie się fali wapniowej i silny wzrost [Ca²⁺]_c w wierzchołku łągiełki pyłkowej.

Na podstawie badań u *Papaver rhoeas* skonstruowano model wyjaśniający powstanie fali wapniowej w łągiełce pyłkowej [15]. Aktywacja zlokalizowanej w błonie fosfolipazy C powoduje rozpad PIP₂ i powstanie IP₃. Podwyższenie poziomu IP₃ prowadzi do uwolnienia Ca²⁺ z organelli posiadających wrażliwe na IP₃ kanały jonowe. Niewielki wzrost [Ca²⁺]_c do ok. 500 nM inicjuje pierwotną falę wapniową, która powodując efekt domina wzmacnia pierwotny sygnał. Indukowany przez IP₃ wzrost stężenia Ca²⁺ był inicjowany w odległości nie dalszej niż 100 μm od wierzchołka łągiełki pyłkowej. Jest to region, w którym kończy się strefa bogata w ER i mitochondria. Pojawiają się tam inne organelle cytoplazmatyczne, w tym wakuole oraz jądro wegetatywne i komórka generatywna. Pozostaje kwestią do rozstrzygnięcia, który z kompartmentów komórkowych – korytkalne ER czy też wakuola – odpowiedzialne są za magazynowanie i uwalnianie Ca²⁺.

Kalmodulina i kalmodulino-zależna regulacja białek. Rola kalmoduliny w procesach pozapyleniowego rozwoju ziaren pyłkowych nie jest ostatecznie wyjaśniona. Obecność kalmoduliny stwierdzono we wszystkich dotychczas badanych ziarnach pyłkowych [16, 59] oraz łągiełkach pyłkowych zarówno tych rosnących w warunkach *in vitro* [59], jak i *in vivo* [26]. Powszechność występowania tego wiążącego wapń białka [55] wskazuje, iż kalmodulina jest niezbędna w procesach kiełkowania ziaren pyłkowych i wroście łągiełek pyłkowych. Podobnie jak w przypadku Ca²⁺ w rosnących łągiełkach pyłkowych poziom kalmoduliny tworzy gradient – najwyższe stężenie tego białka występuje na wierzchołku łągiełki [59]. Utrzymanie *tip-to-base* gradientu Ca²⁺ wydaje się być procesem zależnym od kalmoduliny. Eksperymentalne zastosowanie antagonistów tego białka powodowało rozpad *tip-to-base* gradientu Ca²⁺ i ostatecznie prowadziło do zahamowania wzrostu łągiełek pyłkowych [39, 43]. Mechanizmy oddziaływania kalmoduliny na białka uczestniczące w regulacji wzrostu łągiełki pozostają do dnia dzisiejszego niewyjaśnione. Badania biochemiczne ekstraktów uzyskanych z rosnących łągiełek pyłkowych *Nicotiana alata* wykazały, że kalmodulina w mikromolarnych stężeniach nie wpływa na poziom zależnej od Ca²⁺ fosforylacji białek. Jednakże zahamowanie CaM przez trifluoroperazynę powodowało znaczącą stymulację procesu fosforylacji. Może to wskazywać na udział kalmoduliny w procesie defosforylacji białek [46]. Nie wyjaśniono dotychczas, które z białek uczestniczących we wroście łągiełek są regulowane w drodze Ca/kalmodulino-zależnej. Uważa się, że w łągiełce pyłkowej może funkcjonować kalmodulino-zależna pompa Ca²⁺ [43]. Jest to wysoce prawdopodobne w świetle informacji wskazujących, że magazynowanie Ca²⁺ jest

regulowane przy udziale kalmoduliny [1]. Inna hipoteza zakłada, że kalmodulina uczestniczy w funkcjonowaniu cytoszkieletu łagiewki pyłkowej, biorąc udział w bezpośredniej interakcji z miozyną i aktyną [39]. U *Agapanthus umbellatus* region podwyższonego poziomu kalmoduliny w wierzchołkowej strefie łagiewki tworzy swoistego rodzaju „kołnierz” o kształcie litery V poniżej regionu apikalnego [39]. Zatem lokalizacja kalmoduliny pokrywa się z lokalizacją włókien aktynowo-miozynowych, które nie sięgają samego szczytu łagiewki [38]. Wskazuje to, że kalmodulina nie uczestniczy w samym procesie sekrecji, a co za tym idzie w ukierunkowaniu wzrostu łagiewki pyłkowej. Potwierdzają to badania eksperymentalne – reorientacja łagiewki jest w niewielkim tylko stopniu zależna od antagonistów i aktywatorów kalmoduliny [39]. Zmiana kierunku wzrostu łagiewki pyłkowej wydaje się być regulowana przez Ca^{2+} -zależne kalmodulino-niezależne kinazy białkowe.

Ca^{2+} -zależne kalmodulino-niezależne kinazy białkowe. W rosnących *in vitro* łagiewkach pyłkowych *Agapanthus umbellatus* obecna jest kalmodulino-niezależna kinaza białkowa o charakterystyce kinazy białkowej C (PKC), tj. kinazy aktywowanej wapniem i fosfolipidami błonowymi [40]. Wykorzystując fluorescencyjny marker bisindolilomaleamid, który wiąże się z kinazami białkowymi i charakteryzuje się wysoką specyficznością wobec PKC, stwierdzono, że na wierzchołku łagiewki pyłkowej występuje enzym o aktywności kinazy białkowej C. Najwyższe stężenie tego enzymu zlokalizowano na szczycie wierzchołka łagiewki. Informacji na temat funkcji PKC podczas wzrostu łagiewek pyłkowych dostarczyły badania eksperymentalne z zastosowaniem inhibitorów i aktywatorów tego enzymu. Podanie inhibitora H7 prowadziło do rozpadu gradientu PKC i zahamowania jej aktywności, czego efektem było zatrzymanie wzrostu łagiewek pyłkowych. Konsekwencją asymetrycznej mikroiniekcji aktywatora PKC – z boku wierzchołka łagiewki – była zmiana kierunku jej wzrostu. Dowodzi to udziału PKC w reorientacji wzrostu łagiewki pyłkowej. Uważa się, że zlokalizowana w wierzchołku łagiewki PKC uczestniczy w regulacji kanałów wapniowych – aktywacja enzymu prowadzi do hamowania ich działalności [40].

3.2. Mechanizmy ukierunkowania wzrostu łagiewki pyłkowej

Stabilność *tip-to-base* gradientu Ca^{2+} oraz udział asymetrycznych zmian poziomu tych jonów w orientacji wzrostu łagiewki pyłkowej wydają się być mocno udokumentowane. Jednakże mechanizmy, dzięki którym lokalny napływ wapnia do cytosolu łagiewki określa miejsce wzrostu wierzchołka, nie są ostatecznie wyjaśnione. Jaffe i wsp. [22] zasugerowali, że miejscowe pobieranie Ca^{2+} generuje pole elektryczne, którego rezultatem może być elektroforetyczne przemieszczanie białek błonowych oraz cząstek obecnych w cytoplazmie wierzchołkowej łagiewki. Druga z hipotez zakładała, iż lokalne pobieranie jonów Ca^{2+} działa jako sygnał informacyjny, który ujawnia swój efekt poprzez komunikację z cytoszkieletem [48].

Na obecnym etapie badań, które pokazały, że zmiana pola elektrycznego reguluje aktywność kanałów wapniowych [14, 33], a IP_3 podnosi poziom wolnych Ca^{2+} [15], nadal poszukuje się odpowiedzi na pytanie, dzięki regulacji jakich zjawisk cytoplazmatycznych stężenie $[Ca^{2+}]_c$ wpływa na ukierunkowanie wierzchołka łagiewki pyłkowej? Informacje uzyskane w ciągu ostatnich kilku lat wskazują, że poziom Ca^{2+} w łagiewce pyłkowej odgrywa rolę w dwu, regulowanych niezależnie procesach: wierzchołkowej sekrecji, dzięki której następuje wzrost łagiewki pyłkowej oraz w funkcjonowaniu cytoszkieletu, który odpowiada za kierunek przepływu cytoplazmy i transport materiału błonowego z rejonów jego syntezy do plazmolemy.

Zagadnienia roli $[Ca^{2+}]_c$ w regulacji białek związanych z funkcjonowaniem cytoszkieletu oraz wierzchołkową egzocytozą w łagiewkach pyłkowych były przedmiotem dyskusji kilku ostatnio opublikowanych prac [29, 40, 54, 58]. W ukierunkowaniu wzrostu łagiewki ważną rolę odgrywa zarówno stabilność *tip-to-base* gradientu wapnia, jak i możliwość szybkiej lokalnej zmiany poziomu tych jonów w określonych miejscach cytoplazmy jej wierzchołka. Podstawowym elementem cytoszkieletu łagiewki pyłkowej są filamenty aktynowe wraz z miozyną. Podbłonowy cytoszkielet jest odpowiedzialny za „fontannowy” ruch cytoplazmy łagiewki oraz polarny transport pęcherzyków sekrecyjnych do jej wierzchołka [8]. Cytoplazma szczytu wierzchołka łagiewki pozbawiona jest uorganizowanego cytoszkieletu [38]. W funkcjonowanie cytoszkieletu aktynowego i ruch cytoplazmy włączone są: obniżony poniżej wierzchołka poziom Ca^{2+} oraz Rho GTPazy [29]. Te elementy wapniowego systemu informacyjnego prawdopodobnie regulują białka uczestniczące w organizacji cytoszkieletu.

Przypuszcza się, że głównymi białkami odpowiadającymi na zmiany stężenia $[Ca^{2+}]_c$ w łagiewce są roślinne homologi aneksyn [29, 40] oraz wiliny/gelsoliny [54]. Aneksyny to grupa białek wiążących Ca^{2+} i fosfolipidy błonowe [2]. Obecność białek wiążących przeciwciała do zwierzęcych aneksyn stwierdzono w apikalnym regionie łagiewek pyłkowych kukurydzy [6]. O lokalizacji aneksyn decyduje poziom jonów wapniowych [2]. W stężeniu poniżej 300 nM białka te występują głównie w cytozolu, gdzie mogą uczestniczyć w tworzeniu wiązek filamentów aktynowych. Gdy poziom Ca^{2+} wzrasta do ok. 700 nM, aneksyny wiążą się z fosfolipidami błonowymi. W środowisku, w którym poziom jonów wapniowych jest wyższy aniżeli 1000 nM – a takie warunki panują na szczycie wierzchołka łagiewki – białka te w całości pozostają związane z błonami [53]. Białko o właściwościach wiliny/gelsoliny zlokalizowano na terenie cytoszkieletu aktynowego łagiewki pyłkowej *Lilium longiflorum* [54, 58]. Białko to należy do grupy tzw. białek fragmentujących i jest prawdopodobnie odpowiedzialne za rozpad cytoszkieletu aktynowego na szczycie wierzchołka łagiewki pyłkowej [58].

Ukierunkowany transport pęcherzyków nie obejmuje szczytowej części łagiewki, ponieważ nie zawiera cytoszkieletu [38]. Uważa się, iż w niewielkiej odległości od błony komórkowej ruch pęcherzyków jest przypadkowy. Miejsce fuzji wyznaczają

właściwości plazmolemy i otaczającego ją środowiska – wysoki, milimolarny poziom Ca^{2+} , który występuje tylko w szczytowej części wierzchołka łagiewki, aktywność kanałów jonowych oraz obecność związanych z błoną aneksyn [40]. Sygnalizowane drogą fosfatydyloinozitolową asymetryczne zmiany poziomu Ca^{2+} (wynikające z PKC zależnej regulacji kanałów wapniowych – ich hamowania na szczycie łagiewki oraz otwierania „z boku”, IP_3 zależnego uwalniania Ca^{2+} z organelli do cytosolu oraz ich usuwania poza plazmolemę) prowadzą do lokalnych zmian właściwości błony komórkowej w obrębie wierzchołka łagiewki. Aneksyny przypuszczalnie uczestniczą w zakotwiczeniu pęcherzyków wydzielniczych w błonie komórkowej i wypierając Ca^{2+} z przestrzeni pomiędzy plazmolemą a pęcherzykiem umożliwiają fuzję membran [2, 6]. Regulacja białek uczestniczących w wierzchołkowej egzocytozie odbywa się przy udziale Rop GTPazy [29]. Włączane „boczenie” pęcherzyki wyznaczają nowy wierzchołek łagiewki pyłkowej, dzięki czemu łagiewka zmienia kierunek wzrostu. Reorganizacja cytoszkieletu łagiewki pyłkowej, odpowiedzialnego za ukierunkowany przepływ cytoplazmy, jest zjawiskiem wtórnym mającym miejsce po ukształtowaniu się nowego wierzchołka [40]. W proces ten zaangażowane są kinazy białkowe regulowane prawdopodobnie przy udziale Rho GTPaz [29].

4. PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat dostarczyły przekonujących dowodów, że w łagiewkach pyłkowych roślin kwiatowych funkcjonuje fosfatydyloinozitolowy szlak przekazywania sygnałów. W komórkach tych wykazano obecność białek G, PI-specyficznej fosfolipazy C, IP_3 i IP_3 -zależnej regulacji $[\text{Ca}^{2+}]_c$, kalmoduliny oraz Ca^{2+} -zależnej kalmodulino-niezależnej kinazy białkowej. Uważa się, że fosfatydyloinozitolowy szlak informacyjny uczestniczy w regulacji wzrostu i orientacji łagiewki pyłkowej przez oddziaływanie na białka zaangażowane w funkcjonowanie cytoszkieletu oraz wierzchołkową egzocytozę.

LITERATURA

- [1] ARNON K, COOC B, MONTELL C, SELINGER Z, MINKE B. Calmodulin regulation of calcium stores in phototransduction of *Drosophila*. *Science* 1997; **275**: 1119–1121.
- [2] BANDOROWICZ-PIKUŁA J. Role of annexin, Ca^{2+} and phospholipid-binding proteins, within the cell – from fusion of biological membranes to signal transduction. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 151–167.
- [3] BARAŃSKA J. Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej. *Post Biochem* 1998; **44**: 201–208.

- [4] BEDNARSKA E. The effect of exogenous Ca^{2+} ions on pollen grain germination and pollen tube growth – investigation with the use of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and Verapamil, La^{3+} and ruthenium red. *Sex Plant Reprod* 1989; **2**: 53–58.
- [5] BEDNARSKA E. Localization of calcium-dependent ATPase in germinating pollen grain and pollen tube in *Vicia faba*. *Folia Histochem* 1993; **31**: 147–151.
- [6] BLACKBOURN HD, BATTEY NH. Annexin-mediated secretory vesicle aggregation in plants. *Physiol Plant* 1993; **89**: 27–32.
- [7] BUSH DS. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995; **46**: 95–122.
- [8] CAI G, MOSCATELLI A, CRESTI M. Cytoskeletal organization and pollen tube growth. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 86–91.
- [9] CARAFOLI E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 395–433.
- [10] CARPITA NC, GIBEAUT DM. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 1993; **3**: 1–30.
- [11] CHEN QY, BOSS WF. Neomycin inhibits the phosphatidylinositol monophosphate and phosphatidylinositol biphosphate stimulation of plasma-membrane ATPase activity. *Plant Physiol* 1991; **96**: 340–343.
- [12] CHO MH, TAN Z, ERNEUX C, SHEARS SB, BOSS WF. The effect of mastoparan on the carrot cell plasma-membrane poly-phosphoinositide phospholipase C. *Plant Physiol* 1995; **107**: 845–856.
- [13] DRØBAK BK, WATKINS PAC. Inositol(1,4,5)-triphosphate production in plant cells: stimulations by the venom peptides, melitin and mastoparan. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 739–745.
- [14] FEIJÓ JA, MALHÓ R, OBERMEYER G. Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 1995; **187**: 155–167.
- [15] FRANKLIN-TONG VE, DRØBAK B, ALLAN AC, WATKINS PA. Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-triphosphate. *Plant Cell* 1996; **8**: 1305–1321.
- [16] GOŁASZEWSKA B, BEDNARSKA E, NARBUTT O. Immunocytochemical localization of calmodulin in fertile and sterile anther of *Allium cepa* L. *Acta Biolog Cracov Ser Bot* 2000; w druku.
- [17] HANCOCK JF, MARSHALL CJ. Posttranslational processing of ras and ras-related proteins. [w:] Lacal JC, McCormic F [red.] The Ras Superfamily of GTPases, Boca Raton, FL: CRC Press, 1993; 65–84.
- [18] HEPLER PK. The growth on pollen tubes: calcium leads way. *Trends Plants Sci* 1997; **2**: 79–81.
- [19] HEPLER PK, HOLDAWAY-CLARKE TL, HACKETT G, LANCELLE SA, KUNKEL J. Exocytosis in pollen tubes: Regulation by calcium. *J Exp Bot* 1997; **48** (suppl): 4.
- [20] HISCOCK SJ, KÜES U, DICKINSON HG. Molecular mechanisms of self-incompatibility in flowering plants and fungi: different means to the same end. *Trends Cell Biol* 1996; **6**: 421–428.
- [21] HOLDAWAY-CLARCE TL, FEIJÓ JA, HACKETT GR, KUNKEL JG, HEPLER PK. Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* 1997; **9**: 1999–2010.
- [22] JAFFE LF, ROBINSON KR, NUCITELLI R. Local cation entry and self-electrophoresis as an intracellular localization mechanism. *Annu NY Acad Sci* 1974; **238**: 372–389.
- [23] JAUH GY, LORD EM. Localization of pectins and arabogalactan proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style and their possible roles in pollination. *Planta* 1996; **199**: 251–261.

- [24] KRZYWICKA E, KOWALCZYK S. Molekularne mechanizmy samoniezgodności homomorficznej zapobiegające samozapłodnieniu roślin okrytonasiennych. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 75–98.
- [25] LENARTOWSKA M, RODRIGUEZ-GARCIA M, BEDNARSKA E. The part of pectins in the postpollination interaction of the male gametophyte with the somatic cells of pistil in *Petunia hybrida* Hort. [w] Congress Materials, XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction. Wageningen, 1998; 91.
- [26] LENARTOWSKA M, RODRIGUEZ-GARC M, BEDNARSKA E. Immunocytochemical localization of calmodulin in the unpollinated and pollinated style of *Petunia hybrida* Hort. [w] Congress Materials, XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction. Wageningen, 1998; 90.
- [27] LI YQ, CHEN F, LINSSENS HF, CRESTI M. Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod* 1994; **7**: 145–152.
- [28] LIN Y, WANG Y, ZHU J-K, YANG Z. Localization of a Rho GTPase implies a role in tip growth and movement of the generative cell in pollen tubes. *Plant Cell* 1996; **8**: 293–303.
- [29] LIN Y, YANG Z. Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggest a crucial role for Rho-type GTPases in the control of tip growth. *Plant Cell* 1997; **9**: 1647–1659.
- [30] LOMMEL C, FELLE HH. Transport of Ca^{2+} across the tonoplast of intact vacuoles from *Chenopodium album* L. suspension cells: ATP-dependent import and inositol-1,4,5-trisphosphate-induced release. *Planta* 1996; **201**: 477–486.
- [31] McCORMIC S. Self-incompatibility and other pollen-pistil interaction. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 18–25.
- [32] MALHÓ R, READ ND, PAIS MS, TREWAVAS AJ. Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth. *Plant J* 1994; **5**: 331–341.
- [33] MALHÓ R, READ ND, TREWAVAS AJ, PAIS MS. Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *Plant Cell* 1995; **7**: 1173–1184.
- [34] MALHÓ R, TREWAVAS AJ. Localized apical increased of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 1996; **8**: 1935–1949.
- [35] MASCARENHAS JP. Molecular mechanism of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 1993; **5**: 1303–1314.
- [36] MESSERLI M, ROBINSON KR. Tip localized Ca^{2+} pulses are coincident with peak pulsative growth in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1269–1278.
- [37] MILLER DD, CALLAHAM DA, GROSS DJ, HEPLER PK. Free Ca^{2+} gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. *J Cell Sci* 1992; **101**: 7–12.
- [38] MILLER DD, LANCELLE SA, HEPLER PK. Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma* 1996; **195**: 123–132.
- [39] MOUTINHO A, LOVE J, TREWAVAS AJ, MALHÓ R. Distribution of calmodulin protein and mRNA in growing pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 1998; **11**: 131–139.
- [40] MOUTINHO A, TREWAVAS AJ, MALHÓ R. Relocation of Ca^{2+} -dependent protein kinase activity during pollen tube reorientation. *Plant Cell* 1998; **10**: 1499–1509.
- [41] NAGATA K-I, HALL A. The Rho GTPase regulates protein kinase activity. *Bioessays* 1996; **7**: 529–531.
- [42] OBERMEYER G, LÜTZELSCHWAB M, HEUMANN HG, WEINSENSEEL MH. Immunolocalization of H^{+} -ATPases in the plasma membrane of pollen grains and pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma* 1992; **171**: 55–63.
- [43] OBERMEYER G, WEINSENSEEL MH. Calcium channel blocker and calmodulin antagonists affect the gradient of free calcium ions in lily pollen tubes. *Eur J Cell Biol* 1991; **56**: 319–327.
- [44] PIERSON ES, MILLER DD, CALLAHAM DA, SHIPLEY AM, RIVERS BA, CRESTI M, HEPLER PK. Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion influx and the

- intracellular calcium gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* 1994; **6**: 1815–1828.
- [45] PIERSON ES, MILLER DD, CALLAHAM DA, VAN AKEN J, HACKETT G, HEPLER PK. Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol* 1996; **174**: 160–173.
- [46] POLYA GM, MICUCCI V, RAE AL, HARRISON PJ, CLARKE AE. Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation in germinated pollen of *Nicotiana glauca*, an ornamental tobacco. *Physiol Plant* 1986; **67**: 151–157.
- [47] QUARMBY LM, YUEH YG, CHESHIRE JL, SNELL WJ, CRAIN RC. Inositol phospholipid metabolism may trigger flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 1992; **116**: 737–744.
- [48] QUATRANO RS. Development of cell polarity. *Annu Rev Plant Physiol* 1978; **29**: 487–510.
- [49] RIDLEY AJ. Rho: Theme and variations. *Curr Biol* 1996; **6**: 1256–1264.
- [50] TAYLOR CW, TRAYNOR D. Calcium and inositol triphosphate receptors. *J Membrane Biol* 1995; **145**: 109–118.
- [51] TRETYN A. Wapń w komórkach eukariotycznych, PWN Warszawa 1994.
- [52] TREVAWAS AJ, MALHÓR. Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *Plant Cell* 1997; **9**: 1181–1195.
- [53] TROTTER PJ, ORCHARD MA, WALKER JH. Ca^{2+} concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membranes. *Biochem J* 1995; **308**: 591–598.
- [54] VIDALI L, YAKOTA E, CHEUNG AY, SHIMMEN T, HEPLER PK. The 135 kDa actin-bundling protein from *Lilium longiflorum* pollen is the plant homologue of villin. *Protoplasma* 1999; **209**: 283–291.
- [1] VOGEL HJ. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem Cell Biol* 1994; **72**: 357–376.
- [55] WANG JP, NEEDLEMAN DH, SERYSHEV AB, AGHDASI B, SLAVIK KJ, LIU SQ, PEDERSEN SE, HAMILTON SL. Interaction between ryanodine and neomycin binding sites on Ca^{2+} release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8387–8393.
- [56] WHELER MJ, ALLAN AC, JORDAN ND, RUDD JJ, FRANKLIN-TONG VE, FRANKLIN FCH. The intracellular events triggered by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Protoplasma*; 1999; **208**: 99–106.
- [57] YAKOTA E, TAKAHARA K, SHIMMEN T. Actin-bundling protein isolated from pollen tubes of lily: biochemical and immunocytochemical characterization. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1421–1429.
- [58] ZANG G, CASS DD. Calcium signaling in sexual reproduction of flowering plants. *Recent Res Devel in Plant Physiol* 1997; **1**: 75–83.
- [59] ŻYLIŃSKA L, RĘBAS E, LACHOWICZ A, ŁACHOWICZ L. Białka G – najważniejsze sygnalizatory komórkowe? *Post Biochem* 1998; **44**: 158–163.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 08.03.2000 r.

Przyjęto: 14.06.2000 r.

Adres autora: ul. Arciszewskiego 22a, 76-200 Słupsk,

e-mail: Bednarska@wsp.slupsk.pl

BIAŁKO p27: BUDOWA, FUNKCJE BIOLOGICZNE ORAZ UDZIAŁ W PATOMECHANIZMIE PROCESÓW ROZROSTOWYCH*

CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR p27: STRUCTURE, ROLE IN CELL PHYSIOLOGY AND IN MALIGNANCIES

Lidia CISZAK¹, Dariusz WOŁOWIEC², Agata KOSMACZEWSKA¹,
Dorota BOĆKO¹, Irena FRYDECKA^{1,2}

¹Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław

²Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych AM, Wrocław

Streszczenie: Białko p27, należące do rodziny inhibitorów kinaz cyklino-zależnych zwanej CIP/KIP, stanowi obecnie przedmiot intensywnych badań z zakresu biologii komórki i patomechanizmów procesów rozrostowych. Białko to nie tylko kontroluje ono cykl komórkowy poprzez regulację aktywności kompleksów CDK-cyklina, ale uczestniczy także w indukcji apoptozy. Białko p27 reguluje aktywność holoenzymów CDK-cyklina w dwojaki sposób. Po pierwsze, hamuje ono aktywność kompleksów kinazowych. Z badań krystalograficznych kompleksu utworzonego przez fragment N-końcowy p27, kinazę CDK2 i cyklinę A wynika, iż przyczyną zahamowania aktywności kompleksu kinazowego są istotne zmiany konformacyjne wewnątrz i wokół kieszeni katalitycznej enzymu, które prowadzą do zaburzenia procesu przyłączania ATP. Po drugie, białko p27 uczestniczy w procesie powstawania stabilnych kompleksów CDK4-cyklina D1. Zwiększa ono powinowactwo CDK4 do cykliny D1, wpływa na poziom syntezy cyklin typu D w komórce oraz na stabilność cykliny D1. Białko p27 uczestniczy także w transporcie cykliny D1 i CDK4 do jądra komórkowego. Wyniki najnowszych badań wskazują ponadto na bardziej złożony charakter oddziaływania pomiędzy białkiem p27 a kompleksami kinazowymi. Białko p27 jest z jednej strony regulatorem aktywności holoenzymów CDK-cyklina, z drugiej zaś strony poziom jego stężenia w komórce jest pośrednio kontrolowany przez kompleks CDK2-cyklina E, który fosforyluje znajdującą się w pozycji 187 cząsteczki p27 treoninę. Fosforylacja ta stanowi sygnał do proteolitycznej degradacji białka p27 przez kompleks proteazy 26S. Stosunkowo mało wiadomo jest natomiast o wpływie białka p27 na apoptozę. Nie udzielono ostatecznej odpowiedzi na pytanie, w jakich warunkach p27 indukuje zaprogramowaną śmierć komórki, a w jakich ją hamuje. Z uwagi na istotną rolę białka p27 w kontrolowaniu prawidłowej proliferacji komórki i w apoptozie ostatnio wiele uwagi poświęcono

*Pracę wykonano w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych nr 4 P05B 073 16.

zaburzeniom poziomu jego ekspresji w rozrostach nowotworowych. Ekspresja inhibitora p27 w guzach nowotworowych wykazuje często zaburzenia: jest ona najczęściej obniżona w stosunku do tkanek prawidłowych, co może mieć duże znaczenie rokownicze. Informacje te mogą być wykorzystane w opracowaniu nowych strategii leczniczych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 481–503)

Słowa kluczowe: inhibitory kinaz cyklino-zależnych, rodzina białek CIP/KIP, białko p27, nowotwór złośliwy

Summary: P27 protein, which belongs to CIP/KIP family of cyclin-dependent kinase inhibitors, is the subject of a large number of studies in cell biology and pathogenesis of neoplastic proliferation. The protein controls not only cell cycle by regulating activity of cyclin-CDK complexes, but it is also involved in apoptosis. P27 protein regulates the activity of cyclin-CDK complexes in two distinct ways. First, it inhibits the activity of the cyclin-CDK complexes. The crystal structure of N-terminal portion of p27, CDK2 and cyclin A complex reveals, that p27 binding causes large conformational changes in and around the catalytic cleft of enzyme, which eliminate any potential for ATP binding. These structural changes are likely to be determinants of inhibition. Second, p27 promotes assembly of stable CDK4-cyclin D1 complexes. It increases the affinity of kinase CDK4 to cyclin D1, influences D-type cyclin levels and cyclin D1 stability. P27 protein facilitates nuclear accumulation of cyclin D1 and CDK4 kinase, too. Recent studies indicated, that the interaction between p27 and cyclin-CDK complexes is more complicated than it had been supposed before. On the one hand p27 protein can be regulator of CDK-cyclin complexes and on the other hand the level of p27 protein in the cell is directly controlled by CDK2-cyclin E complex, which causes phosphorylation of p27 on treonine 187. This phosphorylation is a signal to p27 degradation by ubiquitin-proteasome pathway. Little information is available on the role of p27 protein in apoptosis. We don't know the finally answer on the question when p27 induces programmed cell death and when it inhibits apoptosis. Because p27 protein plays an important role in regulation of cell proliferation and in apoptosis, a special attention of a large number of studies has been given how the disturbances in the level of this protein affect malignant transformation. The expression of p27 protein in human tumor cells most frequently is diminished comparatively to their normal counterparts, and, in some instances, may have prognostic importance. This information could have clinical application.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 481–503)

Key words: cyclin-dependent kinase inhibitors, the CIP/KIP protein family, p27, malignancy

Wykaz stosowanych skrótów: PCNA – jądrowy antygen komórki proliferującej, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β , cAMP – cykliczny adenozynomonofosforan.

WSTĘP

Kinazy cyklino-zależne (ang. *Cyclin-Dependent Kinases* – CDK) pełnią podstawową rolę w regulacji proliferacji komórek eukariotycznych. Aktywacja tych enzymów w ściśle określonych fazach cyklu podziałowego warunkuje jego właściwy przebieg, a w szczególności jest niezbędna do replikacji DNA oraz mitozy. Dotąd zidentyfikowano u człowieka kilkanaście białek należących do tej rodziny, z których najważniejsze i najlepiej poznane określone zostały jako CDK1–CDK9 [18, 77, 82, 96]. Aktywność kinaz cyklino-zależnych jest regulowana co najmniej na trzech różnych poziomach. Po pierwsze: aktywacja enzymatyczna CDK wymaga przy

łączenia podjednostki regulatorowej, którą stanowi białko zwane cykliną. Znanych jest obecnie kilkanaście cyklin, określanych kolejnymi literami alfabetu od A do H [28, 30, 38, 44, 82, 95]. Cykliczność ich syntezy i rozkładu, od której pochodzi nazwa tej grupy białek, warunkuje kolejność aktywacji i inaktywacji kinaz CDK. W komórkach ssaków przejście przez fazę G1 regulują kompleksy CDK4/CDK6-cyklina typu D (D1, D2 i D3) oraz CDK2-cyklina E, podczas gdy CDK2-cyklina A, CDK1-cyklina A i CDK1-cyklina B kontrolują dalsze etapy cyklu podziałowego. Po drugie: pełną aktywność enzymatyczną kompleksy CDK-cyklina uzyskują w wyniku fosforylacji odpowiedniej dla danej kinazy reszty treoniny przez kinazę aktywującą CDK, zwaną CAK (CDK7-cyklina H) [77]. Fosforylacja reszt tyrozyny (Tyr) i treoniny (Thr) przez Wee1 hamuje natomiast aktywność CDK [2, 45, 60]. Po trzecie: aktywność kinaz CDK jest regulowana przez białkowe inhibitory, które powodują zatrzymanie cyklu komórkowego w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe sygnały antyproliferacyjne [19, 29, 34, 35, 38, 66, 67, 88]. Opierając się na homologii strukturalnej i podobieństwie funkcjonalnym inhibitory te podzielono na dwie grupy. Pierwsza z nich, zwana rodziną INK4, zawiera białka: p16 [31, 78], p15 [31, 34], p18 [31] i p19 [10, 32], łączące się wybiórczo z CDK4 i CDK6, których podjednostkę regulatorową stanowią cykliny typu D (D1, D2 i D3) [praca przeglądowa: 13]. Inhibitory należące do tej grupy współzawodniczą z cyklinami typu D o wiązanie z CDK4 i CDK6. Wspólnym elementem struktury cząsteczek należących do tej grupy są tzw. powtórzenia ankyrinowe (ang. *ankyrin-like repeats*), które odgrywają ważną rolę w wiązaniu inhibitorów z rodziny INK4 z kinazami: CDK4 i CDK6 oraz w hamowaniu aktywności tych enzymów [7, 73, 101]. CDK4 i CDK6 są kinazami białka pRb (białko supresorowe) [44, 86, 93, 96]. Oddziaływanie przedstawicieli z grupy INK4 z CDK4 i CDK6 reguluje więc fosforylację cząsteczki pRb. W postaci nieufosforylowanej pRb wiąże się z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi niezbędnymi do łączenia się polimeraz RNA: I, II i III z DNA i rozpoczęcia transkrypcji [4, 86, 93]. Fosforylacja pRb powoduje uwalnianie czynników transkrypcyjnych z kompleksów z pRb i aktywację polimeraz RNA, co prowadzi w rezultacie do aktywacji genów fazy S i wzmożonej biosyntezy białka [4, 44, 86, 93].

Drugą grupę inhibitorów kinaz CDK stanowi rodzina określana mianem CIP/KIP, zawierająca białka: p21, p27 i p57, kodowane odpowiednio przez geny: *WAF1* (zwany również *CIP1*), *KIP1* i *KIP2* [35, 52, 66, 67, 88, 98]. Białka te, w przeciwieństwie do przedstawicieli rodziny INK4, wiążą się z kinazą CDK związaną z cykliną, a nie z postacią monomeryczną. Białka te hamują działanie kompleksów kinazowych: cyklina typu D z CDK4 i CDK6 w fazie G1, CDK2 z cykliną A i E w fazie S, a także – aczkolwiek w mniejszym stopniu – mitotycznego kompleksu cyklina B-CDK1 [44, 47, 67, 88].

W strukturze cząsteczek należących do rodziny CIP/KIP wyróżnić można dwie domeny: N-końcową i C-końcową. Domena N-końcowa jest niezbędna i jedno-

częście wystarczająca do wiązania białek z grupy CIP/KIP z kompleksem kinazowym oraz hamowania jego aktywności, z tego też względu określana jest mianem domeny inhibitorowej [67]. Stwierdzono, że fragmenty N-końcowe białek p21, p27 i p57 wykazują duży stopień homologii (ok. 40%), podczas gdy fragmenty C-końcowe tych cząsteczek różnią się między sobą zarówno długością, jak i sekwencją aminokwasową. Domeny C-końcowe białek p21 i p57 są odpowiedzialne za wiązanie z jądrowym antygenem komórki proliferującej PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) i mogą hamować syntezę replikacyjną DNA zależną od PCNA [91, 92].

Należące do rodziny CIP/KIP białko p27, kodowane przez gen *KIP1* (ang. *cdk inhibitory protein 1*) [66], zostało wykryte jednocześnie przez kilka zespołów badawczych w komórkach różnych linii, których cykl podziałowy był zatrzymany w fazie G1 w wyniku kontaktowej inhibicji wzrostu [66] lub po zadziałaniu egzogennych czynników antymitotycznych, takich jak: TGF- β [66], cAMP i rapamycyna [42] czy lowastyna [35]. Inhibitor p27 stanowi obecnie przedmiot intensywnych badań z zakresu biologii komórki i patomechanizmu procesów rozrostowych ze względu na to, iż odgrywa on istotną rolę nie tylko w regulacji aktywności kompleksów CDK-cyklina, kontrolując tym samym prawidłową proliferację komórkową, ale uczestniczy także w indukcji apoptozy.

BUDOWA BIAŁKA p27

Ludzkie białko p27 jest zbudowane ze 198 aminokwasów i migruje w żelu poliakryloamidowym z szybkością odpowiadającą masie cząsteczkowej około 28 kDa [35, 67]. Jego sekwencja aminokwasowa jest aż w 90% identyczna z sekwencją aminokwasową cząsteczek p27 wyizolowanych z komórek myszy i norki [67].

Podobnie jak w przypadku białek p21 i p57 w strukturze cząsteczki p27 wyróżnić można dwie domeny: N-końcową (inhibitorową) i C-końcową.

Budowa domeny C-końcowej białka p27

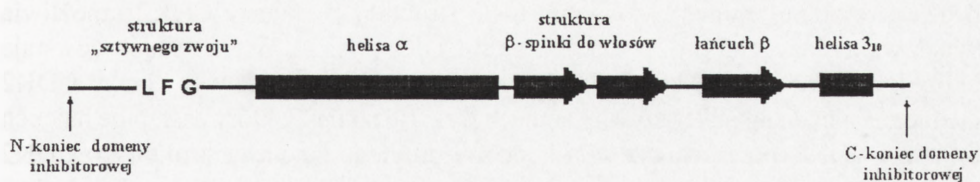
W domenie C-końcowej cząsteczki p27, podobnie jak w przypadku należącego do tej samej grupy inhibitorów białka p21, zidentyfikowano tzw. „sekwencję lokalizacji jądrowej”, która decyduje o skierowaniu p27 do jądra komórkowego po zakończeniu jego syntezy w cytosolu [67]. W regionie C-końcowym cząsteczki p27 nie stwierdzono natomiast, w przeciwieństwie do białek: p21 i p57, obecności sekwencji aminokwasowej umożliwiającej wiązanie z PCNA. Tak więc fragment C-końcowy p27 pełni inne funkcje biologiczne niż analogiczne fragmenty cząsteczek p21 i p57. Najnowsze wyniki badań wskazują, że domena C-końcowa białka p27 uczestniczy w procesie indukcji aktywności proteazy Tsap (ang. *ptwenty-seven-activated protease*), występującej w komórce w formie utajonej [5]. Proteaza ta

odcina fragment N-końcowy cykliny A, zawierający tzw. „boks destrukcyjny” (ang. *destruction box*), który jest niezbędny do proteolitycznej degradacji cyklin z udziałem układu ubikwitynowego [28]. Być może więc, domena C-końcowa białka p27 indukuje w sposób pośredni degradację cykliny A niezależną od obecności „boku destrukcyjnego” [5].

Budowa domeny N-końcowej oraz mechanizm oddziaływania inhibitora p27 z kompleksem CDK-cyklina

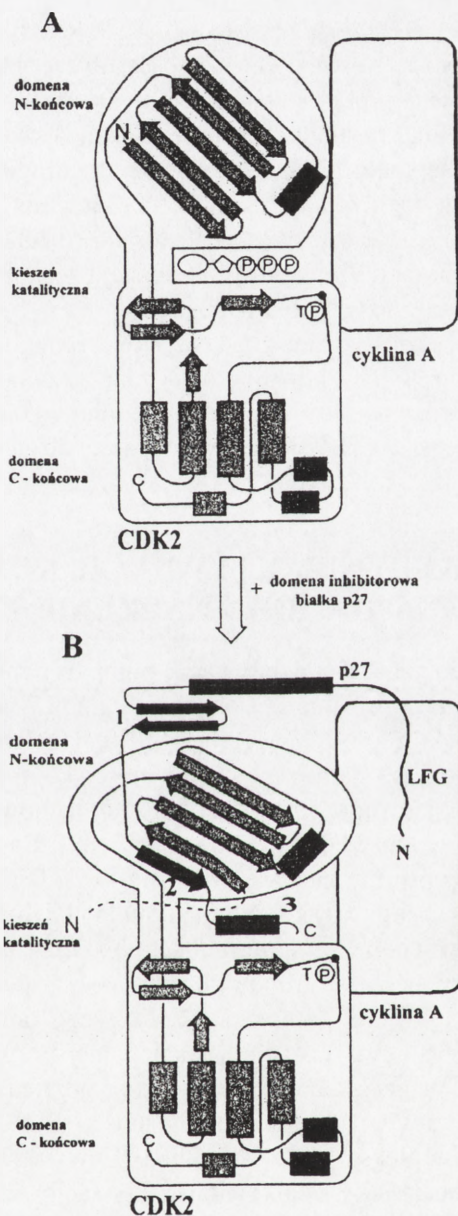
Prowadzone jednocześnie w kilku ośrodkach naukowych badania dotyczące oddziaływania między p27 a różnymi kompleksami kinazowymi wykazały, że p27 jest inhibitorem następujących kompleksów: CDK2-cyklina E, CDK2-cyklina A, CDK4-cyklina typu D oraz CDK1-cyklina B1, aczkolwiek jego powinowactwo do tych kompleksów jest różne [26, 35, 42, 66, 67, 88]. Stwierdzono, iż w warunkach *in vitro* p27 najsilniej hamuje aktywność kompleksu CDK2-cyklina E, a najslabiej CDK1-cyklina B1 [67]. W interakcję białka p27 z kompleksami kinazowymi zaangażowana jest domena N-końcowa cząsteczki p27 [67]. Dokładną budowę tego fragmentu cząsteczki p27 poznano dzięki analizie struktury przestrzennej kryształu utworzonego przez domenę inhibitorową białka p27 (obejmującą 69 aminokwasów domeny N-końcowej), kinazę CDK2, z ufosforylowaną w pozycji 160 treoniną, i cyklinę A [72]. Stwierdzono, iż w obrębie domeny inhibitorowej cząsteczki p27 wyróżnić można tzw. „sztywny zwój” (ang. *rigid coil*, reszty aminokwasowe: 26–35), amfipatyczną helisę α (reszty: 37–59), amfipatyczną strukturę β -spinki do włosów (reszty: 61–71), łańcuch β (reszty: 75–81) i helisę 3_{10} (reszty: 85–90) (rys. 1).

W jaki sposób białko p27 wiąże się z kompleksami kinazowymi i hamuje ich aktywność? Wiele istotnych informacji uzyskano dzięki porównaniu budowy kryształu potrójnego kompleksu złożonego z domeny inhibitorowej p27, CDK2 i cykliny A ze strukturą kryształu podwójnego kompleksu CDK2–cyklina A [40]. Wykazano, iż w wyniku związania z kompleksem CDK2-cyklina A domena inhibitorowa p27 staje się strukturą nieglobularną i rozciągniętą, co umożliwia jej interakcję z dużą powierzchnią kompleksu kinazowego [72]. Z badań krystalograficznych ponadto wynika, że kinaza CDK i cyklina wiążą się z p27 w dwóch różnych miejscach



RYSUNEK 1. Struktura domeny inhibitorowej białka p27 (wg [72])

domeny inhibitorowej p27 i z tego też powodu CDK i cyklina mogą łączyć się z p27 w sposób niezależny od siebie. Białko p27 wiąże się jednak z kompleksem kinazowym znacznie silniej niż z pojedynczymi podjednostkami kompleksu kinazowego, tzn. z cyklina i CDK osobno [6, 68]. W oddziaływanie z cyklina A zaangażowane są aminokwasy tworzące tzw. „sztywny zwój” oraz amfipatyczną helisę α , podczas gdy pozostałe elementy strukturalne domeny inhibitorowej p27 uczestniczą w wiązaniu kinazy CDK2 (rys. 2). Bardzo ważną rolę w procesie łączenia p27 z cząsteczką cykliny A odgrywa obecna w nim struktura „sztywnego zwoju”, zbudowana z 10 aminokwasów, wśród których w pozycji 32, 33 i 34 występują odpowiednio: leucyna (Leu), fenyloalanina (Phe) oraz glicyna (Gly). Sekwencja ta, określana jako motyw LFG, jest obecna we wszystkich inhibitorach z rodziny KIP/CIP. Wykazano, iż Leu 32 i Phe 33 motywu LFG wiązane są, za pośrednictwem wiązań wodorowych oraz oddziaływań van der Waalsa, wewnątrz płytkiego rowka uformowanego w cząsteczce cykliny A przez helisy: $\alpha 1$, $\alpha 3$ i $\alpha 4$ „boks cyklinowego” (ang. *cyclin box*). Region ten jest bardzo konserwatywny w strukturze białek należących do grupy cyklin [28]. Stwierdzono jednak, że oddziaływanie domeny inhibitorowej białka p27 nie powoduje żadnych zmian strukturalnych w obrębie cząsteczki cykliny A i służy ono najprawdopodobniej do wstępnego zakotwiczenia p27 w strukturze kompleksu CDK2-cyklina A i ułatwienia interakcji inhibitora p27 z kinazą CDK2. W oddziaływanie pomiędzy domeną inhibitorową p27 a kinazą CDK2 są zaangażowane aminokwasy tworzące strukturę amfipatycznej β -spinki do włosów i helisy 3_{10} cząsteczki p27 oraz domenę N-końcową CDK2 (struktura β złożona z 5 łańcuchów) i kieszeń katalityczną enzymu (miejsce wiązania substratu i ATP) (rys. 2). Pięć pasm struktury β tworzy jak gdyby „dach” kieszeni katalitycznej i odgrywa krytyczną rolę w wiązaniu ATP przez kompleks kinazowy. Wykazano, iż oddziaływaniu domeny inhibitorowej p27 z CDK2 towarzyszą zmiany konformacyjne wewnątrz i wokół kieszeni katalitycznej kinazy, które prowadzą w konsekwencji do zaburzenia procesu przyłączania ATP. **Po pierwsze:** przyłączenie domeny inhibitorowej p27 do kompleksu CDK2-cyklina A powoduje przesunięcie pierwszego łańcucha struktury β domeny N-końcowej kinazy CDK2 (reszty aminokwasowe: 1–13) oraz spłaszczenie struktury β i wyeksponowanie reszt aminokwasów hydrofobowych, które mogą oddziaływać z cząsteczką p27. Utworzenie sieci wiązań wodorowych pomiędzy resztami aminokwasowymi 75–81 łańcucha β p27 a resztami aminokwasowymi 16–22 struktury β kinazy CDK2 umożliwia wbudowanie łańcucha β p27 w strukturę β CDK2 (rys. 2). W ten sposób powstaje hybrydowa struktura β , która składa się z czterech łańcuchów β kinazy CDK2 i jednego łańcucha β p27. Sztywny łańcuch β cząsteczki p27, który zastępuje łańcuch β kinazy CDK2, przesunął część N-końcową drugiego łańcucha struktury β CDK2 o 8,5 Å, oddzielając je częściowo od struktury β , co powoduje otwarcie „dachu” tej części kieszeni katalitycznej, która jest odpowiedzialna za wiązanie ATP. **Po drugie:** otwarcie części kieszeni katalitycznej umożliwia wiązanie w niej helisy



RYSUNEK 2. Wpływ związania domeny inhibitorowej białka p27 na strukturę kompleksu CDK2-cyklina A (wg [55]). A: Struktura ufosforylowanego kompleksu CDK2-cyklina A; B: Struktura potrójnego kompleksu: domena inhibitorowa p27-ufosforylowana kinaza CDK2-cyklina A. W wyniku związania domeny inhibitorowej p27 przez kompleks CDK2-cyklina A dochodzi do następujących zmian konformacyjnych: 1- struktura β -spinki do włosów p27 tworzy tzw. „kanapkę” (*sandwich*) ze strukturą β domeny N-końcowej CDK2 powodując spłaszczenie struktury β CDK2 i wyeksponowanie reszt aminokwasów hydrofobowych CDK2; 2 - łańcuch β domeny inhibitorowej p27 zostaje wbudowany w strukturę β kinazy CDK2; 3 - helisa 3₁₀ wiąże się głęboko wewnątrz kieszeni katalitycznej CDK2 i zajmuje miejsce wiążące ATP

3_{10} – struktury znacznie większej niż cząsteczka ATP. Reszty aminokwasowe 85–90 helisy 3_{10} wiążą się głęboko wewnątrz kieszeni katalitycznej kinazy CDK2 zajmując miejsce, z którym wiąże się ATP, co prowadzi do zaburzenia procesu przyłączania ATP. **Po trzecie:** badania kryształu podwójnego kompleksu CDK2-cyklina A wykazały, że zwrot β występujący pomiędzy pierwszym i drugim łańcuchem struktury β , zwany pętlą glicynową, związa się nad częścią kieszeni katalitycznej odpowiedzialną za przyłączanie ATP i wiąże reszty fosforanowe ATP. Związanie inhibitora p27 powoduje usunięcie pętli glicynowej i ta pozycja zostaje zajęta przez fragment cząsteczki p27 leżący bezpośrednio za helisą 3_{10} .

Z analizy struktury przestrzennej kryształu utworzonego przez domenę inhibitorową białka p27, kinazę CDK2 i cyklinę A wynika, że związanie jednej cząsteczki p27 przez kompleks kinazowy powoduje istotne zmiany konformacyjne w obrębie kieszeni katalitycznej kinazy CDK2 i jest wystarczające do zahamowania aktywności tego kompleksu [72].

WYSTĘPOWANIE NIEAKTYWNYCH KOMPLEKSÓW p27-CDK4-CYKLINA D I ICH ZNACZENIE FIZJOLOGICZNE

Pierwsze badania dotyczące oddziaływania pomiędzy inhibitorem p27 a kompleksem kinazowym CDK4-cyklina D wskazywały, iż p27 hamuje aktywność tego kompleksu, mierzoną jako zdolność do fosforylacji białka pRB [67, 88]. Stwierdzono jednak, że zdolność p27 do hamowania aktywności kompleksów CDK4-cyklina D1 i CDK4-cyklina D2 jest mniejsza niż zdolność do hamowania aktywności kompleksu CDK2-cyklina E lub CDK2-cyklina A [67, 88]. Badania ostatnich dwóch lat wskazują na występowanie znacznych różnic w oddziaływaniu pomiędzy inhibitorem p27 a kompleksami: CDK4-cyklina typu D i CDK2-cyklina E lub CDK2-cyklina A. Zaobserwowano, iż w warunkach *in vitro* hamowanie aktywności kompleksu CDK2-cyklina A jest proporcjonalne do wiązania inhibitora p27 przez ten kompleks, tzn. hamowanie kompleksu kinazowego oraz wiązanie p27 przez ten kompleks osiągały połowę wartości maksymalnej przy tym samym stężeniu p27 (ok. 20 nM) [6]. W przypadku oddziaływania pomiędzy p27 a kompleksem CDK4-cyklina D2 nie stwierdzono takiej zależności. Białko p27 w stężeniu ok. 640 nM wiąże się z kompleksem CDK4-cyklina D2 w 100%, ale nie hamuje jego aktywności w sposób znaczący. Do całkowitej inaktywacji kompleksu CDK4-cyklina D2 wymagane jest stężenie inhibitora p27 ok. 2560 nM. Obserwowane różnice w oddziaływaniu pomiędzy inhibitorem p27 a kompleksami: CDK4-cyklina typu D i CDK2-cyklina A zdają się potwierdzać wyniki doświadczeń przeprowadzonych w warunkach *in vivo* [6]. Autorzy porównywali zdolność inhibitora p27 do hamowania aktywności kinaz CDK2 i CDK4 w komórkach linii hodowlanej Tet-p27 (wywodzącej się z linii komórek nabłonka płucnego norki Mv1Lu), w których

synteza ludzkiego białka p27 kontrolowana jest przez transaktywator tetracykliny. Kiedy komórki te rosną w medium zawierającym tetracyklinę w wysokim stężeniu (1 µg/ml), nie wytwarzają one egzogenego inhibitora p27. Obecne w proliferujących komórkach linii Mv1Lu oraz komórkach linii Tet-p27 endogenne białko p27 łączy się z kompleksem CDK4-cyklina typu D oraz w mniejszym stopniu z CDK6-cyklina typu D. Obniżenie stężenia tetracykliny w medium powoduje stopniowy wzrost syntezy inhibitora p27 w komórkach linii Tet-p27 (nawet 25-krotny), który wiąże się z kinazą CDK2 i hamuje jej aktywność. Stwierdzono, iż 6-krotne zwiększenie poziomu syntezy białka p27 jest wystarczające do całkowitego zahamowania aktywności kinazy CDK2. Wzrost stężenia inhibitora p27 w komórkach linii Tet-p27 nie powodował natomiast znacznego zwiększenia ilości białka p27 związanego z kompleksem CDK4-cyklina typu D. Obserwacja ta sugeruje, że większość kompleksów CDK4-cyklina typu D obecnych zarówno w komórkach linii Tet-p27, jak i w proliferujących komórkach linii Mv1Lu była już związana z p27. Wzrost poziomu syntezy inhibitora p27 powodował natomiast zwiększenie stężenia kompleksu p27-CDK6-cyklina typu D, co może wskazywać, iż pomiędzy kinazami CDK4 i CDK6 występują różnice w zdolności do oddziaływania z białkiem p27. Wykazano jednocześnie, że wzrost stężenia p27 w komórkach linii Tet-p27 nie spowodował zahamowania aktywności kompleksów CDK4-cyklina typu D i CDK6-cyklina typu D. Z przedstawionych powyżej badań wynika, iż znaczna część obecnych w proliferujących komórkach kinaz CDK4 i CDK6 występuje w stabilnych, potrójnych, aktywnych enzymatycznie kompleksach z cykliną typu D i białkiem p27 [6]. Jaka jest rola fizjologiczna takich kompleksów? Obecnie przypuszcza się, że w proliferujących komórkach kompleksy CDK4-cyklina typu D wiążą białko p27 w celu chwilowego unieczynnienia jego aktywności inhibitorowej [26, 66, 68]. Związanie przez kinazę CDK4 i cyklinę typu D inhibitora p27 mogłoby np. umożliwić funkcjonowanie kompleksu CDK2-cyklina E, którego aktywność jest niezbędna do przejścia komórki przez punkt krytyczny na granicy faz G1 i S cyklu podziałowego. Tak więc oprócz swej funkcji katalitycznej kompleksy CDK4-cyklina typu D pełnią w komórce również rolę niekatalityczną, która polega na „magazynowaniu” białka p27 w komórce i unieczynnianiu jego aktywności inhibitorowej. Są również doniesienia, iż potrójne kompleksy p27-CDK4-cyklina D3 wykazują zmienioną swoistość substratową w porównaniu do podwójnych kompleksów CDK4-cyklina D3. Zaobserwowano, że kompleksy p27-CDK4-cyklina D3 oraz CDK4-cyklina D3 fosforylują aminokwasy znajdujące się w innej pozycji białka pRb [17].

Powstaje jednak pytanie, w jaki sposób stabilne, potrójne kompleksy: CDK4-cyklina typu D-p27 mogą skutecznie fosforylować białko pRb? Z omawianych już w niniejszej pracy badań strukturalnych kryształu utworzonego przez potrójny kompleks – domena inhibitorowa białka p27-CDK2-cyklina A – wynika przecież, iż związanie jednej cząsteczki inhibitora p27 wystarcza do zahamowania aktywności kompleksu kinazowego [72]. Blain i współpr. [6] zaproponowali następujący model

wyjaśniający to zjawisko. Z badań krystalograficznych potrójnego kompleksu domena inhibitorowa białka p27-CDK2-cyklina A wynika, że cząsteczka p27 ma dwa odrębne miejsca wiązania z kinazą CDK i z cykliną [72]. Jak już wspomniano wcześniej, oddziaływanie tzw. motywu LFG, występującego w strukturze „sztywnego zwoju” domeny inhibitorowej p27, z cząsteczką cykliny nie powoduje żadnych zmian strukturalnych w obrębie cykliny. Służy ono najprawdopodobniej do wstępnego zakotwiczenia p27 w strukturze kompleksu CDK-cyklina i ułatwienia interakcji inhibitora p27 z kinazą CDK, w wyniku której dochodzi do zmian konformacyjnych wokół i wewnątrz kieszeni katalitycznej kinazy CDK, prowadzących do inaktywacji kompleksu kinazowego. Przedstawiony powyżej mechanizm oddziaływania pomiędzy p27, CDK i cykliną dotyczy, zdaniem Blaina i współpr. [6], interakcji inhibitora p27, CDK2 i cykliny A, stąd też utworzony przez te trzy białka kompleks nie jest aktywny enzymatycznie. Blain i współpr. [6] uważają jednak, iż związanie białka p27 z cykliną nie zawsze prowadzi do ułatwienia interakcji p27 z kinazą CDK, czego efektem jest utrzymanie aktywności kompleksów CDK-cyklina pomimo obecności w nich inhibitora p27. Taki sposób wiązania charakteryzuje oddziaływanie inhibitora p27 z CDK4 i cykliną typu D. Autorzy modelu sądzą, że w wyniku dołączenia tylko jednej cząsteczki p27 do cykliny typu D powstają pewne przeszkody przestrzenne uniemożliwiające oddziaływanie odpowiednich fragmentów strukturalnych domeny inhibitorowej p27 z kinazą CDK4 i w efekcie utrzymania aktywności enzymatycznej kompleksu kinazowego. Istnieje też możliwość, że dostęp p27 do kinazy CDK4 blokują inne dodatkowe cząsteczki związane z kompleksem CDK4-cyklina typu D, które chronią ten kompleks przed jego inaktywacją. W jaki więc sposób kompleks CDK4-cyklina typu D jest hamowany przez inhibitor p27? Blain i współpr. [6] uważają, że inaktywacja potrójnego kompleksu p27-CDK4-cyklina typu D jest wynikiem przyłączenia dodatkowej cząsteczki p27. Z badań krystalograficznych kompleksu: domena inhibitorowa p27-CDK2-cyklina A wynika jednak, iż kompleksy kinazowe zawierające dwie cząsteczki inhibitora p27 nie są stabilne termodynamicznie [72]. Autorzy nie wykryli ponadto stabilnych kompleksów kinazowych zawierających kilka cząsteczek p27 nawet wtedy, gdy do krystalizacji stosowano wysokie stężenie p27. Niestety struktura krystalograficzna kompleksu p27-CDK4-cyklina typu D jest nie znana. Tak więc problem, czy do inaktywacji kompleksu CDK4-cyklina typu D konieczne jest związanie dodatkowej cząsteczki p27, jak to sugeruje Blain i współpr. [6], nie jest rozstrzygnięty.

ROLA BIOLOGICZNA BIAŁKA p27 ORAZ REGULACJA JEGO STĘŻENIA W KOMÓRCIE

Najwcześniej i najlepiej obecnie poznaną funkcją biologiczną białka p27 jest jego udział w kontrolowaniu przebiegu cyklu komórkowego. W fazie spoczynkowej

(G₀) cyklu podziałowego ponad 50% całkowitej zawartości tego białka w komórce występuje w formie niezwiązanej z kompleksem kinazowym, a pewna jego ilość wykrywalna jest w kompleksie z CDK2 i cyklina A [68]. Stymulacja komórek czynnikami mitogennymi indukuje ekspresję cyklin typu D i tworzenie kompleksów CDK4-cyklina typu D lub CDK6-cyklina typu D, które podobnie jak holoenzym CDK2-cyklina E fosforylują białko pRb [44, 86, 93, 96]. Aktywność wymienionych powyżej kompleksów kinazowych jest niezbędna do przejścia przez fazę G₁ cyklu podziałowego. Z najnowszych badań wynika, że białko p27 przyczynia się do stabilnego wiązania się kinazy CDK4 z cyklina D1 [11, 46]. LaBaer i współpr. [46] wykazali, iż p27 zwiększa aż 80-krotnie powinowactwo CDK4 do cykliny D1. Podobny wpływ na wiązanie CDK4 z cyklina D1 ma należące do tej samej rodziny inhibitorów białko p21, w obecności którego powinowactwo CDK4 do cykliny D1 zwiększa się 35-krotnie [46]. O istotnym udziale białek p27 i p21 w tworzeniu kompleksów CDK4-cyklina D1 świadczą również wyniki doświadczeń przeprowadzonych na embrjonalnych mysich fibroblastach nie mających genów kodujących białka p27 i p21, w których nie wykryto obecności wspomnianych wyżej kompleksów kinazowych [11]. Obecność kompleksów CDK4-cyklina D1 stwierdzono natomiast w tych fibroblastach, do których ponownie wprowadzono jeden z genów kodujących białka p27 lub p21. Z badań Chenga i współpr. [11] wynika także, że białka p27 i p21 wpływają również na syntezę cyklin D1 i D2, gdyż ich stężenie w embrjonalnych fibroblastach mysich nie mających jednego z dwóch genów kodujących inhibitor p27 lub p21 jest znacznie niższe niż w prawidłowych fibroblastach. Białka p27 i p21 wpływają ponadto w nieznanym jeszcze sposobie na stabilność cykliny D1 [11]. Być może wiązanie p27 lub p21 z kompleksem CDK4-cyklina D1 uniemożliwia, przynajmniej częściowo, fosforylację przez ten kompleks kinazowy treoniny występującej w pozycji 286 cząsteczki cykliny D1 [11]. Ponieważ fosforylacja wspomnianej reszty treoniny stanowi sygnał do proteolitycznej degradacji cykliny D1 z udziałem układu ubikwitynowego [16], ograniczenie tego procesu przez białka p27 lub p21 związane z kompleksem CDK4-cyklina D1, może prowadzić do zwiększenia stabilności tej cykliny [11]. Białko p27, podobnie jak i inhibitory p21 oraz p57, uczestniczy też w przemieszczaniu się cykliny D1 do jądra komórkowego [11, 46]. Podczas fazy G₁ cyklu podziałowego cyklina D1 gromadzi się w jądrze komórkowym, a następnie w czasie syntezy DNA (faza S) przemieszcza się do cytoplazmy. W cząsteczce cykliny D1 nie stwierdzono jednak obecności tzw. „sekwencji lokalizacji jądrowej”, która jest odpowiedzialna za skierowanie białka do jądra. W jaki więc sposób cyklina D1 jest transportowana do jądra komórkowego? LaBaer i współpr. [46] udowodnili, że inhibitory rodziny CIP/KIP kierują cyklina D1 do jądra komórkowego za pośrednictwem „sekwencji lokalizacji jądrowej” znajdującej się w ich domenie C-końcowej. W identyczny sposób transportowana jest do jądra komórkowego kinaza CDK4, która także nie ma w swej strukturze „sekwencji lokalizacji jądrowej” [11, 46]. Z tych obserwacji wynika, że białko p27 nie jest,

jak sądzono na początku, jedynie inhibitorem kinaz cyklicznych, ale poprzez: zwiększanie powinowactwa kinazy CDK4 do jej podjednostki regulatorowej, wpływanie na poziom syntezy cyklin typu D w komórce oraz udział w transporcie cykliny D1 i CDK4 do jądra komórkowego uczestniczy także w procesie powstawania stabilnych kompleksów CDK4-cyklicznych typu D w fazie G1 cyklu podziałowego. Kompleksy CDK4-cyklicznych typu D mogą zaś m.in. „maskować” inhibitorową aktywność cząsteczki p27 w celu umożliwienia funkcjonowania kompleksu CDK2-cyklicznych E, którego aktywność jest konieczna do przejścia komórki przez punkt kontrolny na granicy faz G1 i S cyklu podziałowego [26, 66, 68].

Następstwem stymulacji komórek czynnikami mitogennymi jest spadek stężenia białka p27 [26, 50, 61] w wyniku jego degradacji w czasie przejścia z fazy G1 do S. Jakie mechanizmy wewnątrzkomórkowe kontrolują precyzyjnie moment, w którym następuje degradacja białka p27? Z pierwszych badań dotyczących regulacji stężenia inhibitora p27 w komórce wynikało, iż regulacja ta odbywa się na poziomie potranskrypcyjnym, ponieważ ilość mRNA p27 nie zmienia się podczas cyklu podziałowego [36, 67]. Obecnie wiadomo, że spadek stężenia białka p27 obserwowany podczas przejścia komórek z fazy G1 do fazy S jest wynikiem proteolitycznej degradacji tego białka z udziałem lub też bez udziału układu ubiquitynowego [1, 59, 63, 83]. Pagano i wspólnicy [63] wykazali, że białko p27 wiąże się z ubiquityną i następnie ulega proteolizie przez kompleks proteazy 26S. Sygnałem do degradacji inhibitora p27 jest przypuszczalnie fosforylacja treoniny w pozycji 187 cząsteczki p27 przez kompleks CDK2-cyklicznych E [81]. W jaki sposób p27 może być zarówno inhibitorem, jak i substratem kompleksu CDK2-cyklicznych E? Na podstawie wyników badań kinetycznych Sheaff i wspólnicy [81] zaproponowali model wyjaśniający to zjawisko. Autorzy uważają, że proces wiązania białka p27 przez kompleks CDK2-cyklicznych E można podzielić na trzy etapy. Początkowo p27 łączy się luźno z CDK2-cyklicznych E (etap pierwszy). Luźne wiązanie p27 przez kompleks CDK2-cyklicznych E nie powoduje zahamowania aktywności kompleksu kinazowego i sprzyja fosforylacji białka p27. Ta forma kompleksu p27-CDK2-cyklicznych E podlega następnie procesowi powolnego przekształcania w formę katalitycznie nieaktywną, zawierającą silnie związane białko p27 (etap trzeci). W procesie tym wyróżnić można etap pośredni (etap drugi), w którym obie formy kompleksu są w stanie równowagi. Czynnikiem wpływającym na ten stan równowagi jest stężenie ATP [81]. ATP w niskim stężeniu (poniżej 50 μM) indukuje proces silnego wiązania p27 przez kompleks CDK2-cyklicznych E, p27 jest więc głównie inhibitorem. Zwiększenie stężenia ATP z 50 do 1000 μM wpływa natomiast hamująco na proces silnego wiązania cząsteczki p27 przez kompleks kinazowy, promując tym samym jej fosforylację. Obserwacja ta wskazuje, iż ATP nie może wiązać się z kompleksem CDK2-cyklicznych E zawierającym silnie związane białko p27 [81]. Z badań Alessandriniego i wspólnicy [1] wynika ponadto, że enzymem odpowiedzialnym za fosforylację białka p27 może być też kinaza ERK1, należąca do rodziny kinaz MAP.

Interesujące wydaje się również to, iż proteolityczna degradacja inhibitora p27 przez kompleks proteazy 26S odbywa się jedynie w cytoplazmie, pomimo iż kompleks proteazy 26S jest obecny także w jądrze komórkowym [76]. Z badań Tomody i współpr. [87] wynika, że w transporcie inhibitora p27 z jądra do cytoplazmy uczestniczy białko kodowane przez gen *Jab1*. Białko to oddziałuje z cząsteczką p27 w jądrze komórkowym, transportuje ją do cytoplazmy i być może ułatwia jej sforylację w pozycji Thr187.

Z najnowszych badań Shirane i współpr. [83] wynika, że proteoliza białka p27 przez kompleks proteazy 26S po uprzednim związaniu p27 z ubikwityną nie stanowi jedyne go mechanizmu degradacji tego białka. Shirane i współpr. [83] uważają, iż kompleks proteazy 26S katalizuje reakcję częściowej proteolizy inhibitora p27 niezwiązanego z ubikwityną, w wyniku której odcięty zostaje fragment odpowiedzialny za wiązanie z cykliną. Powstały w następstwie proteolizy około 22-kilodaltonowy fragment jest następnie degradowany przez proteazę określaną jako proteaza podobna do kalpajny (ang. *calpain-like protease*), ponieważ jej aktywność jest hamowana przez inhibitor kalpajny – N-acetylo-dwójleucyno-norleucinal [83].

Badania ostatnich dwóch lat wskazują, że białko p27 uczestniczy nie tylko w kontrolowaniu proliferacji komórek, ale jest również zaangażowane w proces apoptozy. Katayose i współpr. [41] wykazali, iż nadekspresja genu *KIP1* kodującego białko p27 w komórkach różnych linii nowotworowych prowadzi do apoptoz tych komórek. Apoptoza indukowana przez nadekspresję genu *KIP1* osiągała najwyższy poziom po 72 godzinach od chwili zakażenia komórek adenowirusem zawierającym ten gen. Hiromura i współpr. [37] zaobserwowali natomiast, że nie syntetyzujące białka p27 komórki mezangialne i fibroblasty ulegają apoptozie przy braku czynników wzrostu w medium hodowlanym. Wprowadzenie do tych komórek plazmidu z genem kodującym białko p27 zmniejszało znacznie odsetek komórek apoptotycznych. Powstaje więc pytanie, czy białko p27 indukuje, czy też hamuje apoptozę? Hiromura i współpr. [37] zaproponowali następujący model opisujący udział białka p27 w proliferacji komórek i procesie apoptozy. W komórkach proliferujących w obecności czynników wzrostu spadek stężenia białka p27 jest ściśle zsynchronizowany ze zwiększeniem aktywności kompleksów: CDK2-cyklina E i CDK2-cyklina A. Ponieważ kinaza CDK2 jest aktywowana przez cyklinę E podczas późnej fazy G1, a przez cyklinę A w fazie S i G2 cyklu komórkowego, aktywność tych dwóch holoenzymów CDK2-cyklina E i CDK2-cyklina A decyduje o tym, iż komórki przechodzą przez kolejne etapy cyklu i się dzielą. W warunkach stresu, jakim jest np. usunięcie czynników wzrostu z medium, spadkowi stężenia białka p27 towarzyszy znaczny wzrost aktywności kompleksu CDK2-cyklina A, natomiast aktywność kompleksu CDK2-cyklina E jest znacznie obniżona. Wzrost aktywności holoenzymu CDK2-cyklina A bez poprzedzającego go, skoordynowanego wzrostu aktywności kompleksu CDK2-cyklina E może powodować, że komórki przestają się dzielić i ulegają apoptozie. Badania Hiromury i współpr. [37] wykazały, iż

wzrost aktywności kompleksu CDK2-cyklina A w komórkach nie mających genu *KIP1*, poddanych stresowi przez usunięcie czynników wzrostu z ich medium hodowlanego nie wynika z różnic w stężeniu białek: CDK2, cyklina E i cyklina A pomiędzy tymi komórkami a komórkami prawidłowymi, ale jest spowodowany nieobecnością inhibitora p27. Wyniki przedstawionych powyżej doświadczeń wskazują, że białko p27 odgrywa istotną rolę w koordynowaniu prawidłowej proliferacji komórek i ich apoptozy. Brak koordynacji obu tych procesów spowodowany zaburzeniem regulacji stężenia białka p27 może prowadzić do transformacji nowotworowej.

ZABURZENIA EKSPRESJI BIAŁKA p27 W PROCESACH ROZROSTOWYCH

Antyproliferacyjne właściwości p27, a także udział innych inhibitorów CDK, zwłaszcza rodziny INK4, w patogenezie chorób nowotworowych spowodowały, że również i to białko stało się przedmiotem zainteresowania badaczy patologii rozrostowej. Na jego rolę jako antyonkogenu wskazywały też doniesienia, że u myszy nie mających genu kodującego białko p27 rozwijają się samoistnie guzy przysadki mózgowej [24, 43, 57]. Na podstawie tych obserwacji oczekiwano, iż gen *KIP1* może, podobnie jak większość znanych antyonkogenów, ulegać mutacji lub delecji homozygotycznej. Inaktywacja tego genu prowadziłyby do nadmiernej aktywacji kompleksów CDK-cykliny, a tym samym do nadmiernej aktywności proliferacyjnej komórek i ich transformacji nowotworowej. Choć w badaniach nad rakiem piersi [25] i rozrostami hematologicznymi [94] nie wykazano delecji homozygotycznej ani mutacji genu *KIP1*, zastosowanie metod immunohistochemicznych pozwoliło na wykazanie, że zawartość białka p27 w nowotworach różnego pochodzenia jest mniejsza niż w prawidłowej tkance. W odróżnieniu jednak od białek rodziny INK4, obniżony poziom p27 nie jest wynikiem zaburzeń struktury lub ekspresji genu, lecz zwiększonej proteolizy białka [48, 49]. Już pierwsze prace poświęcone implikacjom klinicznym tego zjawiska wykazały jego niezależne od innych czynników prognostycznych niekorzystne znaczenie rokownicze co do wolnego od choroby i/lub całkowitego przeżycia w raku sutka [8, 69] i jelita grubego [49]. Stwierdzono też związek pomiędzy poziomem tego białka a stopniem zróżnicowania raka piersi: w raku inwazyjnym dobrze zróżnicowanym wysoki jego poziom wykazano u 45 spośród 56 pacjentek, w umiarkowanie zróżnicowanym był on obniżony u 56 spośród 84 chorych (67%), w nisko zróżnicowanym zaś obniżenie poziomu p27 wykazano u prawie wszystkich, bo aż u 27 spośród 28 badanych pacjentek. Spośród 12 chorych, u których zbadano poziom p27 w guzie pierwotnym oraz w jego przerzutach, u 5 była ona zbliżona w obu tych ogniskach, u 7 zaś niższa w przerzucie niż w guzie pierwotnym [8]. W badaniach Lloyda

i współpr. [48] przeprowadzonych na skrawkach 177 nowotworów różnego pochodzenia wykazano natomiast, że w większości przypadków poziom p27 jest niższy w komórkach nowotworowych niż odpowiadających im prawidłowych tkankach, w gruczolakorakach zaś niższy niż w gruczolakach. Ta ostatnia obserwacja znalazła potwierdzenie w badaniach poziomu p27 w patologii przytarczyc. Był on najwyższy w prawidłowej tkance gruczolowej i obniżał się kolejno w grupie hiperplazji, gruczolaków oraz gruczolakoraków [20].

W ostatnich trzech latach opublikowano wiele prac potwierdzających te doniesienia o niekorzystnym co do całkowitego lub wolnego od choroby przeżycia znaczeniu rokowniczym obniżonej zawartości p27 w różnych nowotworach: raku piersi [12, 33, 97], gruczołu krokowego [89, 100], powierzchniowym raku pęcherza moczowego [79], nabłonkowym raku jajnika [58], płaskonabłonkowym raku języka [53], gruczolakoraku przełyku [84], raku żołądka [56, 62], jelita grubego [64], trzustki [51], wątroby [39], niedrobnokomórkowym raku oskrzela [9, 22, 102], chłoniakach nieziarnicznych [21, 54]. W nielicznych tylko typach nowotworów niekorzystne znaczenie rokownicze ma podwyższony poziom p27. Stwierdzono to w inwazyjnych rakach szyjki macicy HPV-pozytywnych [15] i wielkomórkowych rozlanych chłoniakach linii B [74]. W nowotworach tych być może, w wyniku interakcji z innymi białkami, np. C-MYC, dochodzi do gromadzenia się nieaktywnych cząsteczek p27. Wysoka zawartość p27 w komórkach nowotworowych ma też niekorzystne znaczenie rokownicze w przewlekłej białaczce limfatycznej: towarzyszy ona skróconemu czasowi podwajania się liczby limfocytów oraz masy guza, wysokim stadium zaawansowania klinicznego oraz zahamowaniem spontanicznej apoptozy *in vitro*. Progresji zaś klinicznej choroby towarzyszy również zwiększenie zawartości p27 w komórkach białaczkowych [90]. Biorąc pod uwagę istotną rolę zaburzeń apoptozy w patogenezie tej białaczki można przypuszczać, iż niekorzystny wpływ p27 na dynamikę rozwoju choroby ma związek nie z jego działaniem antyproliferacyjnym, lecz wynika z przedłużenia życia limfocytów białaczkowych przez zahamowanie ich zaprogramowanej śmierci. Należy tu jednak wspomnieć, że w badaniach nad rakiem piersi [97], jamy ustnej i gardła [27] oraz żołądka [62] stwierdzono odwrotny niż w przewlekłej białaczce limfatycznej związek pomiędzy poziomem p27 a apoptozą, tzn. wyższej zawartości tego białka towarzyszył zwiększony odsetek komórek apoptotycznych. Te rozbieżności mogą odzwierciedlać sygnalizowany wcześniej różny, zależny od rodzaju badanych komórek wpływ p27 na przebieg zaprogramowanej ich śmierci.

Ze względu na fizjologiczną rolę p27 jako inhibitora proliferacji, wiele uwagi poświęcono wpływowi jego deficytu w komórkach nowotworowych na ich aktywność podziałową. Większość badań nie wykazała jednak oczekiwanej zależności pomiędzy zawartością p27 a powszechnie stosowanymi wskaźnikami potencjału proliferacyjnego komórek, takimi jak poziom białka jądrowego Ki-67 (np. [15, 62, 64, 80, 84]). Zależność taką wykazano tylko w przypadku chłoniaków nieziarnicznych

[54, 70, 75], z wyjątkiem dwóch klas: wielkokomórkowych rozlanych chłoniaków linii B, gdzie dużej aktywności podziałowej towarzyszy wysoki poziom p27, oraz chłoniaków strefy płaszcza, których typowa odmiana cechuje się niskim potencjałem proliferacyjnym i niewykrywalną zawartością p27 [70, 74]. Należy jednak podkreślić, że niewykazanie związku pomiędzy zawartością p27 a wskaźnikami aktywności proliferacyjnej nie jest jeszcze dowodem na brak wpływu deficytu tegoż białka na potencjał podziałowy komórki. Badania Catzavelosa i współprac. [8] oraz Lody i współprac. [49] wykazały, że obniżonemu poziomowi p27 towarzyszy podwyższona aktywność kinazowa zależna od CDK2, cykliny A oraz cykliny E przy niezmienionych parametrach cyklu komórkowego.

Istotny jest też związek pomiędzy niedoborem p27 a stopniem zróżnicowania nowotworu. Liczne doniesienia potwierdziły wspomnianą uprzednio obserwację Catzavelosa i współprac. [8], że zawartość p27 jest tym mniejsza, im niższy jest stopień zróżnicowania i wyższy stopień złośliwości histologicznej guza. Stwierdzono to m.in. w raku piersi [12, 33, 97], pęcherza moczowego [79], pęcherzykowym tarczycy [85], wątroby [39] i błony śluzowej macicy [3].

Przytoczone doniesienia sugerują, że obniżony poziom p27 występuje szczególnie często w nowotworach nisko zróżnicowanych, o większym histologicznym stopniu złośliwości oraz ich przerzutach. Nasuwa to więc pytanie o miejsce deregulacji ekspresji *KIP1* w procesie karcynogenezy: czy inicjuje ona złośliwą transformację komórek, czy raczej pojawia się wtórnie podczas progresji choroby do postaci mniej zróżnicowanych histologicznie i bardziej inwazyjnych klinicznie. Niedawno wykazano, że zarówno heterozygotyczne, jak i pozbawione genu *kip1* myszy są szczególnie podatne na rozwój nowotworów indukowanych promieniami jonizującymi oraz karcynogenami chemicznymi, ze szczególną predylekcją do guzów przysadki i jelita [23]. Obserwacja ta nie tylko uzasadnia zaliczenie *KIP1* do rodziny genów supresorowych transformacji nowotworowej, ale wskazuje na istotną cechę odróżniającą *KIP1* od innych znanych genów supresorowych, które – zgodnie z hipotezą Knudsona o dwustopniowej mutacji danego locus (ang. *two-mutation lub two-hit criterion*) – tracą właściwości supresorowe dopiero po unieczynnieniu obu swych alleli. Aktywność supresorowa *KIP1* wymagałaby natomiast obecności dwóch funkcjonalnych alleli. Wykazano też, że p27 oddziałuje z pRB: myszy o genotypie *kip1*^{-/-}, *rb*^{+/+} po utracie pozostałego allelu *rb* rozwijają gruczolakoraki przysadki i raki tarczycy wcześniej i o agresywniejszym przebiegu niż myszy *kip1*^{-/-} lub *rb*^{+/+} [65].

Właściwości *kip1* jako genu supresorowego nasuwają myśl o wykorzystaniu go do terapii genowej nowotworów. Dotychczasowe badania na liniach komórkowych i guzach zwierzęcych taką możliwość potwierdzają. Transfekcja komórek linii raka piersi adenowirusem zawierającym sekwencję *KIP1* powoduje spadek aktywności kinazowej zależnej od CDK2, CDK1 i cykliny B1 oraz ich zablokowanie w fazie G1/S w większym stopniu niż transfekcja genem *WAF1/CIP1* [14]. Trans-

fekcja zaś genem *KIP1* linii raka okrężnicy HT29 powoduje obniżenie aktywności kinazowej zależnej od kompleksu CDK2-cykлина E, częściowe zahamowanie wzrostu oraz znaczny wzrost wrażliwości na maślan sodu jako czynnik pobudzający różnicowanie. Wymuszenie natomiast w tychże komórkach ekspresji genu *WAF1/CIP1* prowadzi do zmniejszenia ich gotowości do różnicowania [99]. Opublikowano już pierwsze wyniki badań nad możliwościami wykorzystania *kip1* do leczenia nowotworów zwierzęcych. Zainfekowanie guzów przeszczepialnego raka gruczołu mlekowego myszy adenowirusem zawierającym gen *kip1* spowodowało zmniejszenie się masy guza o prawie 60% (po transdukcji genu *WAF1/CIP1* uzyskano zmniejszenie guza o 18%) oraz wywołało apoptozę komórek nowotworowych [71].

PODSUMOWANIE

Białko p27 jest interesującym obiektem badań zarówno dla biologa komórki, jak i dla badacza zajmującego się patologią nowotworową. Lepsze poznanie właściwości p27 ma znaczenie tak dla zrozumienia mechanizmów regulacji proliferacji komórkowej, jak i dla medycyny klinicznej. Liczne dane potwierdzające znaczenie rokownicze jego poziomu w chorobach nowotworowych mogą być wykorzystane w opracowywaniu nowych strategii leczniczych, a ponadto na uwagę zasługują otwierające się możliwości wykorzystania go w terapii genowej rozrostów złośliwych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALESSANDRINI A, CHIAUR DS, PAGANO M. Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia* 1997; **11**: 342–345.
- [2] ATHERTON-FESSLER S, LIU F, GABRIELLI B, LEE MS, PENG CY, PIWNICA-WORMS H. Cell cycle regulation of the p43cdc2 inhibitory kinases. *Mol Biol Cell* 1994; **5**: 989–1001.
- [3] BAMBERGER AM, RIETHDORF L, MILDELANGOSH K, BAMBERGER CM, THUNEKE I, ERDMANN I, SCHULTE HM, LONING T. Strongly reduced expression of the cell cycle inhibitor p27 in endometrial neoplasia. *Virchows Arch* 1999; **434**: 423–428.
- [4] BARTEK J, BARTKOWA J, LUKAS J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 805–814.
- [5] BASTIANS H, TOWNSLEY FM, RUDERMANN JV. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} induces N-terminal proteolytic cleavage of cyclin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15374–15381.
- [6] BLAIN SW, MONTALVO E, MASSAGUE J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27^{Kip1} with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25863–25872.
- [7] BROTHERTON DH, DHANARAY V, WICH S, BRIZUELA L, DOMAILLE PJ, VOLYANIK E, XU X, PARISINIE, SMITH BO, ARCHER SJ, SERRANO M, BRENNER SL, BLUNDELL

- TL, LAUE ED. Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19^{INK4d}. *Nature* 1998; **395**: 244–250.
- [8] CATZAVELOS C, BHATTACHARYA N, UNG YC, WILSON JA, RONCARI L, SANDHU C, SHAW P, YEGER H, MORAVA-PROTZNER I, KAPUSTA L, FRANSSSEN E, PRITCHARD KI, SLINGERLAND JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} protein: Prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med* 1997; **3**: 227–230.
- [9] CATZAVELOS C, TSAO MS, DeBOER G, BHATTACHARYA N, SHEPHERD FA, SLINGERLAND JM. Reduced expression of the cell cycle inhibitor p27(Kip1) in non small cell lung carcinoma: A prognostic factor independent of ras. *Cancer Res* 1999; **59**: 684–688.
- [10] CHAN FKM, ZHANG J, CHENG L, SHAPIRO DN, WINOTO A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{ink4}. *Mol Cell Biol* 1995; 2682–2688.
- [11] CHENG M, OLIVIER P, DIEHL JA, FEROM, ROUSSEL MF, ROBERTS JM, SHERR ChJ. The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK „inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 1999; **18**: 1571–1583.
- [12] CHU JS, HUANG CS, CHANG KJ. p27 expression as a prognostic factor of breast cancer in Taiwan. *Cancer Letters* 1999; **141**: 123–130.
- [13] CISZAK L, WOŁOWIEC D, KOSMACZEWSKA A, BOĆKO D, FRYDECKA I. Białkowe inhibitory kinaz cyklino-zależnych z rodziny p16: budowa, właściwości biochemiczne i rola biologiczna. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 539–559.
- [14] CRAIG C, WERSTOR, KIM M, OHRIE, LIZ, KATAYOSE D, LEE SJ, TREPEL J, COWAN K, SETH P. A recombinant adenovirus expressing p27^{Kip1} induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997; **14**: 2283–2289.
- [15] DELLAS A, SCHULTHEISS E, LEIVAS MR, MOCH H, TORHORST J. Association of p27Kip1, Cyclin E and c-myc expression with progression and prognosis in HPV-positive cervical neoplasms. *Anticancer Res* 1998; **18**: 3991–3996.
- [16] DIEHL JA, ZINDY F, SHERR ChJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997; **11**: 957–972.
- [17] DONG F, AGRAWAL D, BAGUI T, PLEDGER WJ. Cyclin D3-associated kinase activity is regulated by p27kip1 in BALB/c 3T3 cells. *Mol Biol Cell* 1998; **9**: 2081–2092.
- [18] DYNLACHT BD. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 1997; **398**: 149–152.
- [19] ELLEDGE SJ, HARPER JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 847–852.
- [20] ERICKSON LA, JIN L, WOLLAN P, THOMPSON GB, vanHEERDEN JA, LLOYD RV. Parathyroid hyperplasia, adenomas, and carcinomas differential expression of p27(Kip1) protein. *Am J Surg Pathol* 1999; **23**: 288–295.
- [21] ERLANSON M, PORTIN C, LINDERHOLM B, LINDH J, ROOS G, LANDBERG G. Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas – prognostic implications. *Blood* 1998; **92**: 770–777.
- [22] ESPOSITO V, BALDI A, DeLUCA A, GROGER AM, LODA M, GIORDANO GG, CAPUTI M, BALDI F, PAGANO M, GIORDANO A. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997; **57**: 3381–3385.
- [23] FEROML, RANDEL E, GURLEY KE, ROBERTS JM, KEMP CJ. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 1998; **396**: 177–180.
- [24] FEROML, RIVKIN M, TASCH M, PORTER P, CAROW CE, FIRPO E, POLYAK K, TSAI L-H, BROUDY V, PERIMUTTER RM, KAUSHANSKY K, ROBERTS JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell* 1996; **85**: 733–744.

- [25] FERRANDO AA, BALBIN M, PENDAS AM, VIZOSO F, VELASCO G, LOPEZ-OTIN C. Mutational analysis of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} in primary breast carcinomas. *Hum Genet* 1996; **97**: 91–94.
- [26] FIRPO EJ, KOFF A, SOLOMON MJ, ROBERTS JM. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 4889–4901.
- [27] FUJIEDA S, INUZUKA M, TANAKA N, SUNAGA H, FAN GK, ITO T, SUGIMOTO C, TSUZUKI H, SAITO H. Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1999; **84**: 315–320.
- [28] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego. *Post Biochem* 1993; **39**: 16–25.
- [29] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Regulacja cyklu komórkowego – udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych. *Post Biochem* 1995; **41**: 80–93.
- [30] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Cykliny fazy G1 cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu. *Post Biochem* 1996; **42**: 99–107.
- [31] GUAN K-L, JENKINS CW, LI Y, NICHOLS MA, WU X, OKEEFE CL, MATERA AG, XIONG Y. Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1} and p14^{INK4B/MTS2}-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994; 2939–2952.
- [32] GUAN K-L, JENKINS CW, LI Y, O'KEEFE CL, NOH S, WU X, ZARIWALA M, MATERA AG, XIONG Y. Isolation and characterization of p19^{INK4d}, a p16-related inhibitor specific to CDK6 i CDK4. *Mol Biol Cell* 1996; **7**: 57–70.
- [33] HAN S, PARK K, KIM HY, LEE MS, KIM HJ, KIM YD. Reduced expression of p27Kip1 protein is associated with poor clinical outcome of breast cancer patients treated with systemic chemotherapy and is linked to cell proliferation and differentiation. *Breast Cancer Res Treat* 1999; **55**: 161–167.
- [34] HANNON GJ, BEACH D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β – induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; **371**: 257–261.
- [35] HENGST L, DULIC V, SLINGERLAND JM, LEES E, REED SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 5291–5295.
- [36] HENGST L, REED SI. Translational control of p27^{Kip1} accumulation during the cell cycle. *Science* 1996; **271**: 1861–1864.
- [37] HIROMURA K, PIPPIN JW, FERO ML, ROBERTS JM, SHANKLAND SJ. Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *J Clin Invest* 1999; **103**: 597–604.
- [38] HUNTER T, PINES J. Cyclins and cancer II: cyclin D and cdk inhibitors come of age. *Cell* 1994; **79**: 573–582.
- [39] ITO Y, MATSUURA N, SAKON M, MIYOSHI E, NODA K, TAKEDA T, UMESHITA K, NAGANO H, NAKAMORI S, DONO K, TSUJIMOTO M, NAKAHARA M, NAKAO K, TANIGUCHI N, MONDEN M. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology* 1999; **30**: 90–99.
- [40] JEFFREY PD, RUSSO AA, POLYAK K, GIBBS E, HURWITZ J, MASSAGUE J, PAVLETICH NP. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature* 1995; **376**: 313–320.
- [41] KATAYOSE Y, KIM M, RAKKAR ANS, LIZ, COWAN KH, SETH P. Promoting Apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997; **57**: 5441–5445.
- [42] KATO J, MATSUOKA M, POLYAK K, MASSAGUE J, SHERR ChJ. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994; **79**: 487–496.

- [43] KIYOKAWA H, KINEMAN RD, MANOVA-TODOROVA KO, SOARES VC, HOFFMAN ES, ONO M, KHANAM D, HAYDAY AC, FROHMAN LA, KOFF A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell* 1996; **85**: 721–732.
- [44] KOCIK J, SZCZYLIK C. Regulatory cyklu komórkowego i ich udział w onkogenezie. *Współczesna Onkologia* 1998; **4**: 7–15.
- [45] KORNBLUTH S, SEBASTIAN B, HUNTER T, NEWPORT J. Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Mol Biol Cell* 1994; **5**: 273–282.
- [46] LaBAER J, GARRET MD, STEVENSON LF, SLINGERLAND JM, SANDHU Ch, CHOU HS, FATTAEY A, HARLOW E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997; **11**: 847–862.
- [47] LEES E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 773–780.
- [48] LLOYD RV, JIN L, QIAN X, KULIG E. Aberrant p27^{Kip1} expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 1997; **150**: 401–407.
- [49] LODA M, CUKOR B, TAM SW, LAVIN P, FIORENTINO M, DRAETTA GF, JESSUP JM, PAGANO M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 1997; **3**: 231–234.
- [50] LOIS AF, COOPER LT, GENG Y, NOBORI T, CARSON D. Expression of the p16 and p15 cyclin-dependent kinase inhibitors in lymphocyte activation and neuronal differentiation. *Cancer Res* 1995; **55**: 4010–4013.
- [51] LU CD, MORITA S, ISHIBASHI T, HARA H, ISOZAKI H, TANIGAWA N. Loss of p27(Kip1) expression independently predicts poor prognosis for patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 1999; **85**: 1250–1260.
- [52] MATSUOKA S, EDWARDS MC, BAI C, PARKER S, ZHANG P, BALDINI A, HARPER JW, ELLEDGE SJ. p57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1/CDK} inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995; **9**: 650–662.
- [53] MINETA H, MIURA K, SUZUKI I, TAKEBAYASHI S, AMANO H, ARAKI K, HARADA H, ICHIMURA K, WENNERBERG JP, DICTOR MR. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer* 1999; **85**: 1011–1017.
- [54] MOLLER MB, SKJODT K, MORTENSEN LS, PEDERSEN NT. Clinical significance of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} expression and proliferation in non-Hodgkin's lymphoma: independent prognostic value of p27^{Kip1}. *Br J Haematol* 1999; **105**: 730–736.
- [55] MORGAN DO. The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 767–772.
- [56] MORI M, MIMORI K, SHIRAIISHI T, TANAKA S, UEO H, SUGIMACHI K, AKIYOSHI T. p27 expression and gastric carcinoma. *Nature Med* 1997; **3**: 593.
- [57] NAKAYAMA K, ISHIDA N, SHIRANE M, INOMOTA A, INOUE T, SHISHIDO N, HORII I, LOHDY, NAKAYAMA K. Mice Lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996; **85**: 707–720.
- [58] NEWCOMB EW, SOSNOW M, DEMOPOULOS RI, ZELENIUCH-JACQUOTTE A, SO-RICH J, SPEYER JL. Expression of the cell cycle inhibitor p27 is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. *Am J Pathol* 1999; **154**: 119–125.
- [59] NGUYEN H, GITIG DM, KOFF A. Cell-free degradation of p27^{Kip1}, a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1190–1201.
- [60] NORBURY C, NURSE P. Animal cell cycles and their control. *Ann Rev Biochem* 1992; **61**: 441–470.
- [61] NOURSE J, FIRPO E, FLANAGAN WM, COATS S, POLYAK K, LEE M-H, MASSAGUE J, CRABTREE GR, ROBERTS JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27^{Kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994; **372**: 570–573.

- [62] OHTANI M, ISOZAKI H, FUJII K, NOMURA E, NIKI M, MABUCHI H, NISHIGUCHI K, TOYODA M, ISHIBASHI T, TANIGAWA N. Impact of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) and apoptosis in tumor cells on the overall survival of patients with non-early stage gastric carcinoma. *Cancer* 1999; **85**: 1711–1718.
- [63] PAGANO M, TAM SW, THEODORAS AM, BEER-ROMERO P, DEL SAL G, CHAU V, YEW PR, DRAETTA GF, ROLFE M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; **269**: 682–685.
- [64] PALMQVIST R, STENLING R, OBERG A, LANDBERG G. Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: A clinico-pathological characterization. *J Pathol* 1999; **188**: 18–23.
- [65] PARK MS, ROSAI J, NGUYEN HT, CAPODIECI P, CORDONCARDO C, KOFF A. p27 and Rb are on overlapping pathways suppressing tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6382–6387.
- [66] POLYAK K, KATO J, SOLOMON MJ, SHERR ChJ, MASSAGUE J, ROBERTS JM, KOFF A. P27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; **8**: 9–22.
- [67] POLYAK K, LEE M-H, ERDJUMENT-BROMAGE H, KOFF A, ROBERTS J, TEMPST P, MASSAGUE J. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; **78**: 59–66.
- [68] POON RYC, TOYOSHIMA H, HUNTER T. Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cyclin-CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 1197–1213.
- [69] PORTER PL, MALONE KE, HEAGERTY PJ, ALEXANDER GM, GATTI LA, FIRPO EJ, DALING JR, ROBERTS JM. Expression of cell-cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Med* 1997; **3**: 222–225.
- [70] QUINTANILLA-MARTINEZ L, THIEBLEMONT C, FEND F, KUMAR S, PINYOL M, CAMPO E, JAFFE ES, RAFFELD M. Mantle cell lymphomas lack expression of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol* 1998; **153**: 175–182.
- [71] RAKKAR ANS, LI Z, KATAYOSE Y, KIM M, COWAN KH, SETH P. Adenoviral expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}: a strategy for breast cancer gene therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1836–1838.
- [72] RUSSO AA, JEFFREY PD, PATTEN AK, MASSAGUE J, PAVLETICH NP. Crystal structure of the p27^{Kip1} cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 1996; **382**: 325–331.
- [73] RUSSO AA, TONG L, LEE J-O, JEFFREY PD, PAVLETICH NP. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16^{INK4a}. *Nature* 1998; **395**: 237–243.
- [74] SAEZ AI, SANCHEZ E, SANCHEZ-BEATO M, CRUZ MA, CHACON I, MUNOZ E, CAMACHO FI, MARTINEZ-MONTERO JC, MOLLEJO M, GARCIA JF, PIRIS MA. p27^{KIP1} is abnormally expressed in diffuse large B-cell lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome. *Br J Cancer* 1999; **80**: 1427–1434.
- [75] SANCHEZ-BEATO M, SAEZ AI, MARTINEZ-MONTERO JC, SOL MATEO M, SANCHEZ-VERDE L, VILLUENDAS R, TRONCONE G, PIRIS MA. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{KIP1} in lymphoid tissue. p27^{KIP1} is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 1997; **151**: 151–160.
- [76] SCHEFFNER M. Moving protein heads for breakdown. *Nature* 1999; **398**: 103–104.
- [77] SCLAFANI RA. Cyclin dependent kinase activating kinases. *Curr Opin Cell* 1996; **8**: 788–794.
- [78] SERRANO M, HANNON GJ, BEACH D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; **366**: 704–707.

- [79] SGAMBATO A, MIGALDI M, FARAGLIA B, GARAGNANI L, ROMANO G, DeGAETANI C, FERRARI P, CAPELLI G, TRENTINI GP, CITTADINI A. Loss of p27(KIP1) expression correlates with tumor grade and with reduced disease-free survival in primary superficial bladder cancers. *Cancer Res* 1999; **59**: 3245–3250.
- [80] SGAMBATO A, ZHANG YJ, ARBER N, HIBSHOOSH H, DOKI Y, CIAPARRONE M, SANTELLA RM, CITTADINI A, WEINSTEIN IB. Deregulated expression of p27^{Kip1} in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 1879–1887.
- [81] SHEAFF RJ, GROUDINE M, GORDON M, ROBERTS JM, CLURMAN BE. Cyclin E - CDK2 is a regulator of p27^{Kip1}. *Genes Dev* 1997; **11**: 1464–1478.
- [82] SCHERR ChJ. Mammalian G₁ cyclins. *Cell* 1993; **73**: 1059–1065.
- [83] SHIRANE M, HARUMIYA Y, ISHIDA N, HIRAI A, MIYAMOTO Ch, HATAKEYAMA S, NAKAYAMA K, KITAGAWA M. Down-regulation of p27^{Kip1} by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999; **274**: 13886–13893.
- [84] SINGH SP, LIPMAN J, GOLDMAN H, ELLIS FHJr, AIZENMAN L, CANGI MG, SIGNORETTI S, CHIAUR DS, PAGANO M, LODA M. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; **58**: 1730–1735.
- [85] TALLINI G, GARCIAROSTAN G, HERRERO A, ZELTERMAN D, VIALE G, BOSARI S, CARCANGIU ML. Downregulation of p27(KIP1) and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol* 1999; **23**: 678–685.
- [86] TAYA Y. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *TIBS* 1997; **22**: 14–17.
- [87] TOMODA K, KUBOTA Y, KATO J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27^{Kip1} is instigated by Jab1. *Nature* 1999; **398**: 160–165.
- [88] TOYOSHIMA H, HUNTER T. p27, a novel inhibitor of G₁ cyclin-Cdk proteins kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; **78**: 67–74.
- [89] TSIHLIAS J, KAPUSTA RL, DeBOER G, MORAVA-PROTZNER I, ZBIERANOWSKI I, BAHTTACHARYA N, CATZAVELOS GC, KLOTZ LH, SLINGERLAND JM. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; **58**: 542–548.
- [90] VRHOVAC R, DELMER A, TANG R, MARIE JP, ZITTOUN R, AJCHENBAUM-CYMBALISTA F. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; **91**: 4694–4700.
- [91] WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interacting with PCNA. *Nature* 1994; **369**: 574–578.
- [92] WATANABE H, PAN Z-Q, SCHREIBER-AGUS N, DePINHO RA, HURWITZ J, XIONG Y. Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1392–1397.
- [93] WEINBERG RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; **81**: 323–330.
- [94] WLODARSKA I, MARYNEN P, LaSTARZA R, MECUCCI C, Van den BERGHE H. The ETV6, CDKN1B and D12S178 loci are involved in a segment commonly deleted in various p12 aberrations in different hematological malignancies. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **72**: 229–235.
- [95] WOŁOWIEC D. Cykliny a patologia rozrostowa. *Acta Haematol Pol* 1994; **25**: 195–204.
- [96] WOŁOWIEC D. Kinazy zależne od cyklin. Od biologii molekularnej do patologii. *Post Hig Med Dośw* 1995; **49**: 221–235.
- [97] WU J, SHEN ZZ, LU LS, JIANG M, HAN QX, FONTANA JA, BARSKY SH, SHAO ZM. Prognostic role of p27(Kip1) and apoptosis in human breast cancer. *Br J Cancer* 1999; **79**: 1572–1578.
- [98] XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, CASSO D, KOBAYASHI R, BEACH D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; **366**: 701–704.

- [99] YAMAMOTO H, SOH JW, SHIRIN H, XING WQ, LIM JT, YAO Y, SLOSBERG E, TOMITA N, SCHIEREN I, WEINSTEIN IB. Comparative effects of overexpression of p21(CKip1) and p21(Cip1/Waf1) growth and differentiation in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 1999; **18**: 103–115.
- [100] YANG RM, NAITOH J, MURPHY M, WANG HJ, PHILLIPSON J, DeKERNION JB, LODA M, REITER RE. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 1998; **159**: 941–945.
- [101] YANG R, GOMBART AF, SERRANO M, KOEFFLER HP. Mutational effects on the p16^{INK4a} tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1995; **55**: 2503–2506.
- [102] YATABE Y, MASUDA A, KOSHIKAWA T, NAKAMURA S, KUROISHI T, OSADA H, TAKAHASHI T, MITSUDOMI T, TAKAHASHI T. p27^{KIP1} in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinomas. *Cancer Res* 1998; **58**: 1042–1047.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 27.04. 2000 r.

Przyjęto: 20.06. 2000 r.

Adres autora: 53-114 Wrocław, ul. R. Weigla 12;

e-mail: ciszak@immuno.iitd.pan.wroc.pl

MAKROFAGI GONADY MĘSKIEJ*

TESTICULAR MACROPHAGES

Krzysztof BRYNIARSKI

Katedra Immunologii Collegium Medicum UJ

Słownictwo: Makrofagi gonady męskiej (TMf) należą do populacji niezapalnych makrofagów tkankowych. Komórki te zlokalizowane są w tkance śródmiąższowej jądra, gdzie aktywnie się dzielą. Fizjologicznie nie występują one w świetle kanalików nasiennych. TMf uczestniczą wraz z komórkami Sertoliego w mechanizmie formowania bariery krew-jądro i kształtują specyficzne środowisko tego „uprzywilejowanego immunologicznie” narządu. Makrofagi jąder w sposób parakryny regulują bezpośrednio i pośrednio aktywność endokrynną komórek Leydiga i spermatogenezę. Wzajemne relacje pomiędzy TMf, komórkami Leydiga i komórkami Sertoliego dowodzą silnego powiązania funkcjonalnego, jak też są dowodem oddziaływań układu immunologicznego z endokrynnym. Kooperacja komórek jądra, które warunkują odrębność immunologiczną gonad męskich, jest przedmiotem dalszych badań. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 505–525)

Słowa kluczowe: makrofagi jąder (TMf), komórki Sertoliego, komórki Leydiga, monokiny, bariera krew-jądro, narządy immunologicznie uprzywilejowane

Summary: Testicular macrophages represent the population of non-inflammatory tissue macrophages. They are located in the testicular interstitial tissue, where they are able to proliferate, but physiologically they do not appear in the seminiferous tubules. Testicular macrophages and Sertoli cells are involved in the mechanism of blood-testis barrier, which makes testis an immunologically privileged organ. Testicular macrophages acting paracrinally, directly or indirectly, regulate the endocrinal activity of Leydig cells and spermatogenesis. Mutual relations between testicular macrophages, Leydig cells and Sertoli cells confirm their strong functional dependence as well as cooperation of immune and endocrine systems. Testicular cells relations, which take part in the formation of testis immune independence are still explored.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 505–525)

Key words: testicular macrophages (TMf), Sertoli cells, Leydig cells, monokines, blood-testis barrier, immune-privilege organs

*Praca dofinansowana z programu badawczego KBN.

Makrofagi zaangażowane są w różnorodne funkcje układu odpornościowego w organizmie: poczynając od nieswoistych, takich jak: fagocytoza, usuwanie uszkodzonych, zapalnie zmienionych tkanek oraz ich regeneracja. Pełnią funkcję komórek prezentujących antygen, są źródłem wielu monokin i innych czynników regulacyjnych stanu zapalnego. Większość prac przeglądowych zajmuje się makrofagami jako komórkami układu immunologicznego [37,66], a jedynie nieliczne dotyczą udziału makrofagów w nieimmunologicznych interakcjach tkankowych. Makrofagi tkankowe opisywano w wielu narządach między innymi w śledzionie, wątrobie, węzłach chłonnych, płucach, grasicy, łożysku i macicy. Makrofagi tkankowe postrzegane są jako komórki zaangażowane w procesy regulacyjne w tkance śródmiąższowej także w męskich gruczołach płciowych [32,34].

1. CHARAKTERYSTYKA ANATOMICZNA GONAD MĘSKICH

Jądra stanowią parzyste gruczoły płciowe męskie umieszczone w skórno-mięśniowym worku mosznowym poza jamą brzuszną, co zapewnia temperaturę odpowiednio niższą, optymalną dla procesu spermatogenezy. Jądra otoczone są grubą łączno-tkankową, unaczynioną i silnie unerwioną torebką włóknistą. Ich miąższ podzielony jest na płaciki zawierające kręte kanaliki nasienne, które w części szczytowej płacika przechodzą w kanalik prosty prowadzący do śródmierza. Kanalik prosty stanowi początek drogi wyprowadzającej nasienie. W dolnej części śródmierza kanaliki proste tworzą sieć jądra prowadzącą nasienie do najądra i do nasieniowodu. W płacikach jądra, pomiędzy kanalikami są przestrzenie wypełnione tkanką śródmiąższową, która przypomina budowę tkankę łączną luźną. Zawiera ona naczynia krwionośne i limfatyczne oraz nerwy. Pomiedzy włóknami prekolagenowymi i kolagenowymi znajdują się fibroblasty, makrofagi, komórki tuczne i niezróżnicowane komórki mezenchymatyczne oraz występują grupami komórki gruczołowe Leydiga produkujące hormony płciowe. Trójwarstwowa błona własna kanalika nasiennego zawiera fibroblasty, miofibroblasty oraz włóknistą prekolagenową warstwę wewnętrzną, na której opierają się komórki Sertoliego sięgające do światła kanalika nasieniowódca. Komórki Sertoliego o silnej aktywności fagocytarnej usuwają ciała resztkowe i degenerujący nabłonek plemnikotwórczy, produkują płyn odżywczy dla plemników i izolują komórki spermatogenezy [42].

Makrofagi gonady męskiej [TMf] są zlokalizowane w tkance śródmiąższowej poza kanalikami nasiennymi [35]. Ich liczba wzrasta od urodzenia do uzyskania dojrzałości płciowej [32]. Stanowią one około 25% wszystkich komórek tkanki śródmiąższowej [58]. TMf są populacją stosunkowo słabo poznaną i zasługują na

szczególną uwagę, ze względu na potencjalne możliwości wpływania na procesy immunologiczne w gonadzie męskiej.

2. CHARAKTERYSTYKA CYTOMORFOLOGICZNA MAKROFAGÓW GONADY MĘSKIEJ (TMf)

TMf przybierają różnorodne kształty, od nieregularnych poprzez wydłużone do owalnych. Mają typowe, sferyczne jądro [35]. Chromatyna jądrowa jest zbita i usytuowana brzeżnie. Cytoplazma makrofaga jest mniej obfita niż w komórkach Leydiga, co zaznacza się zarówno w mikroskopie świetlnym, jak i elektronowym [32]. Zawiera umiarkowaną ilość siateczki śródplazmatycznej gładkiej i szorstkiej oraz mitochondria o typowej budowie. TMf, podobnie jak inne Mf tkankowe są zdolne do fagocytozy. Poprzednio określano je jako komórki barwiące się metodą Schiffa [32]. Makrofagi jądrowe wykazują intensywny proces endocytozy. W warunkach *in vitro* pinocyтуją liczne substancje, takie jak: błękit trypanu [58], hCG (ludzką gonadotropinę kosmówkową), albuminę, FSH (folikulotropinę), witaminę A [32] i mieloperoksydazę [36]. Fagocyтуją krwinki czerwone, cząstki węgla [55], drobiny lateksu [46], opsonizowane bakterie *Escherichia coli* czy *Klebsiella pneumoniae* [32], a także zabite lub uszkodzone komórki Leydiga [24]. TMf mają lizosomy o wyraźnie zróżnicowanej wielkości (co obrazuje różne fazy fagocytozy), zawierające liczne enzymy hydrolityczne między innymi kwaśną fosfatazę i sulfatazę arylową [32]. Powierzchnia TMf ma liczne wypustki cytoplazmatyczne, które zapewniają ich kontakt z innymi komórkami [3,32].

Dotychczas nie udało się wyodrębnić jednoznacznego markera powierzchniowego charakterystycznego dla TMf u badanych gatunków. Stwierdza się na nich natomiast kilka markerów wspólnych z makrofagami o innej lokalizacji.

Na TMf szczurów opisywano różne markery, np. ED-1 (obecne również na monocytach i makrofagach) [32,77], ED-2 (charakterystyczne dla makrofagów tkankowych) [32,77] i OX-42, będące odpowiednikiem Mac-1 u myszy. Mac-1 jest receptorem dla fragmentu C3 dopełniacza (CR₃), dlatego też lokalizacja TMf w pobliżu łożyska naczyniowego może mieć istotne znaczenie dla fagocytozy ułatwionej (immunologicznej) [32,55]. TMf szczurze posiadają receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin FcγRIg [32,55,79], a niektóre z nich są MHC klasy II pozytywne [55,58]. Najczęściej opisywanymi markerami Mf myszy, charakterystycznymi również dla TMf są: F4/80 [47], BM-8, MP-23, MOMA-1, MOMA-2 [35], a według naszych badań również marker CD11b (Mac-1) [5,7], który występuje tylko na części dojrzałej populacji TMf [67]. Natomiast ludzkie TMf mają markery HLA-DR (MHC klasy II), CD11b, CD11c, CD14 (receptor dla LPS) i CD68 [15,63]. W stanach zapalnych jąder antygen MHC klasy II jest niekwestionowanym markerem aktywowanych TMf [32].

3. POCHODZENIE TMf

Przyjmuje się ogólnie, że makrofagi zlokalizowane narządowo powstają poprzez zasiedlanie tkanek monocytami wywodzącymi się ze szpiku kostnego. Natomiast w przypadku TMf niektórzy badacze sądzą, że populacja ta składa się z dwóch rodzajów komórek o odmiennym pochodzeniu. Pierwsze, to typowe makrofagi tkankowe o pochodzeniu lokalnym (np. u szczurów jest to populacja ED2⁺), stanowiące 70–80% całej populacji [77]. Drugą natomiast subpopulację stanowią makrofagi pochodzenia szpikowego, u szczurów ED1⁺, ED2⁻, które przywędrowały do jąder jako monocyty i po diapedezie z naczyń kapilarnych osiadły w tkance śródmiąższowej jądra [54]. Dowodem na lokalne pochodzenie TMf jest ich obecność w grzebieniu płciowym już u 11,5-dniowych płodów mysich [57], a w 7 tygodniu ciąży u płodów ludzkich [32]. Uważa się, że TMf pochodzą z komórek pierwotnych obecnych w tkance śródmiąższowej [47,57]. Lokalne podziały komórkowe TMf pozostają pod kontrolą hormonów przysadki [65].

U szczurów pierwsze TMf pojawiają się w 19. dniu życia płodowego. Ich liczba wzrasta gwałtownie między 13. a 20. dniem życia. Dalszy wzrost liczby TMf jest skorelowany z przyrostem masy jądra, która do osiągnięcia dojrzałości płciowej wzrasta około dwukrotnie. Wówczas jeden makrofag przypada na 3 lub 4 komórki Leydiga [47,58]. Z wiekiem stosunek ten ulega zmianie, gdyż liczba TMf wzrasta dwukrotnie, a komórek Leydiga spada o połowę [32]. Do 20. dnia życia osobniczego TMf pozostają luźno rozmieszczone w tkance śródmiąższowej między włóknami kolagenu. Następnie niektóre TMf tworzą zgrupowania (*clusters*) z komórkami Leydiga.

4. INTERAKCJE BEZPOŚREDNIE TMf I KOMÓREK LEYDIGA

Makrofagi są zdolne do interakcji z wieloma różnymi typami komórek o lokalizacji zróżnicowanej anatomicznie. Ich regulacyjny wpływ na komórki tkanki otaczającej zachodzi przez bezpośredni kontakt komórek lub też przez wydzielanie cząstek bioaktywnych [32]. Istnieje pogląd, że makrofagi tkankowe są co najmniej w tym samym stopniu zaangażowane w parakrynnie oddziaływanie z innymi komórkami jak w mechanizmy odpowiedzialne za system obronny gospodarza.

U szczurów makrofagi jąder znajdują się w bezpośrednim kontakcie z komórkami Leydiga przez przeplatające się wzajemnie wypustki cytoplazmatyczne obu tych komórek [32,33]. Na granicy obu komórek stwierdza się obecność lamininy i kolagenu typu IV [32]. TMf tworzą takie połączenia z komórkami Leydiga dopiero po osiągnięciu dojrzałości płciowej szczurów, gdyż wcześniej izolowane są od nich włóknami

kolagenu. W pobliżu palczastych rozgałęzień TMf, zakotwicających makrofagi z komórkami Leydiga [3] zlokalizowanych jest wiele pęcherzyków endocytarnych, których funkcja w tej okolicy nie jest całkowicie wyjaśniona. Występują one u różnych gatunków i tworzą się w czasie najaktywniejszych faz dojrzewania gonad, w okresie poprzedzającym wydzielanie testosteronu. Inną strukturą morfologiczną na granicy kontaktu TMf z komórkami Leydiga jest strefa elektronowo gęsta [32] po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej makrofaga w pobliżu wypustek palczastych. Jest to struktura morfologiczna makrofaga powszechna w miejscu kontaktu z innymi komórkami, np. z limfocytami, której nie obserwuje się między sąsiadującymi TMf [32]. Wykazano że komórki Leydiga wydzielają czynnik hamujący migrację makroflagów (MIF), dzięki któremu w sposób bezpośredni mogą regulować liczbę kooperujących z nimi TMf [54]. Znaczenie funkcjonalne połączeń TMf z komórkami Leydiga zostanie omówione później [3,34,43].

TMf i komórki Leydiga dysponują zatem zdolnością do rozpoznania i wzajemnej adherencji. Komórki Leydiga mogą ponadto tworzyć *in vitro* rozety z limfocytami lub eozynofilami [32]. Jest to proces gatunkowo nieswoisty, gdyż np. komórki Leydiga szczurów przylegają do leukocytów myszy, ludzi i szczurów, co wskazuje na konserwatywny mechanizm adherencji. Molekułami adhezyjnymi, które mogą uczestniczyć w procesie tworzenia rozet, są na komórkach Leydiga NCAM (CD56), na limfocytach β_2 -integryna (CD18) oraz prawdopodobnie CD68 lub CD11b ze strony TMf [15,32].

5. KOOPERACJA TMf Z KOMÓRKAMI LEYDIGA

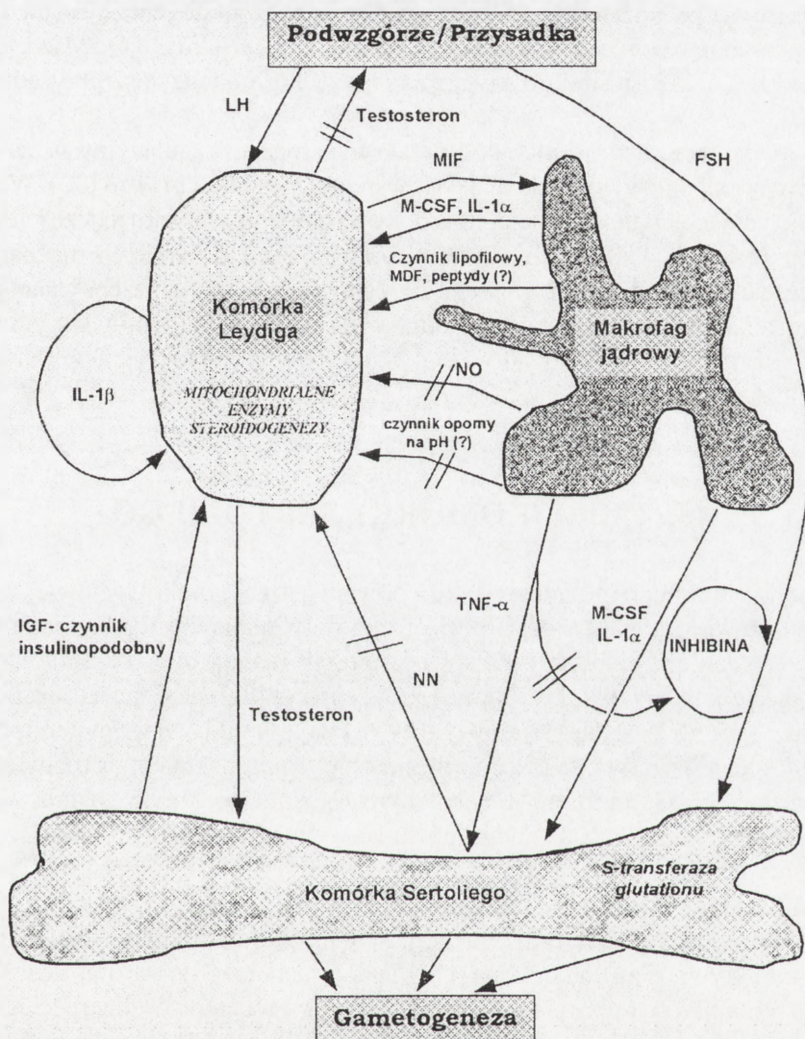
Wpływ TMf na sekrecję testosteronu przez komórki Leydiga jest nie do końca wyjaśniony. *In vitro* wykazywano, że pod wpływem stymulacji FSH, TMf miałyby uwalniać substancje stymulujące wydzielanie testosteronu przez komórki Leydiga [32]. Inni badacze stwierdzali brak wpływu lub wręcz ujemne ich oddziaływanie TMf na aktywność endokrynną komórek Leydiga [2,49,73]. Dostrzeżono natomiast pozytywny wpływ TMf stymulowanych LPS na produkcję testosteronu, niezależny od uwalnianych przez TMf monokin IL-1 i IL-6 [1], choć i w tym przypadku nie było pełnej zgodności poglądów [2].

Wiele badań obrazujących wzajemne zależności komórek Leydiga i TMf przeprowadzono na modelu *in vivo*. Zastosowano techniki wybiórczej eliminacji komórek jądra po dojazdowym podaniu selektywnych czynników toksycznych, które prowadziły bądź do uszkodzenia TMf liposomami z kwasem dwuchlorometylenodwufosforowym – kwasem kłodronowym (KKL) [24], bądź do usunięcia komórek Leydiga sulfonianem etylenodwumetanu – EDS [22]. Badania toksyczności *in vitro* na izolowanych TMf i komórkach Leydiga wykazały silną toksyczność KKL dla

TMf i niewielką dla komórek Leydiga [9]. Wykazano również, że zastosowanie KKL *in vitro* powoduje zahamowanie produkcji testosteronu [4] w komórkach Leydiga. Natomiast EDS podany dojadrowo powoduje specyficzne uszkodzenie komórek Leydiga z następującą po nim infiltracją limfocytów CD4⁺, a następnie limfocytów CD8⁺ o aktywności hamującej limfocyty CD4⁺, co nie korelowało z wydzielaniem hormonów przysadki [31].

Po wstrzyknięciu do prawego jądra liposomów zawierających kwas kłodronowy obserwowano znaczny (do 90%) spadek ilości makrofagów, co w konsekwencji prowadziło do obniżenia produkcji testosteronu w jądrach. Model *in vivo* przedstawia fizjologiczny wpływ makrofagów na aktywność wydzielniczą komórek Leydiga. U szczurów selektywne usunięcie TMf przy pomocy KKL zapobiega odtworzeniu populacji komórek Leydiga usuniętych wcześniej EDS (23), co sugeruje kluczową rolę, jaką odgrywają TMf w proliferacji i różnicowaniu nowych komórek Leydiga. W dalszych badaniach wykazano również bezpośredni lub pośredni wpływ komórek Leydiga na liczbę makrofagów w jądrach [77]. Wpływ TMf na komórki Leydiga może zachodzić kilku sposobami (rys. 1). Może mieć on charakter troficzny [23], regulować procesy steroidogenezy [25], a także działać przez oś przysadka-jądro, głównie przez hormon luteinizujący, powodując aktywację endokrynną komórek Leydiga [22]. Tak więc bliżej nie sprecyzowane produkty TMf (np. czynnik oporny na pH) wpływają na produkcję testosteronu w drodze uruchomienia osi przysadka-jądra, głównie przez hamowanie sekrecji LH, jak i lokalnie przez ujemne sprzężenie zwrotne, przez bezpośredni wpływ tlenu azotu (uwalnianego przez makrofagi) na komórki Leydiga [25]. Istnieje również negatywny obwód regulacyjny, uruchamiany głównie w stanach zapalnych, kontrolujący poziom testosteronu przez TNF- α wytwarzany przez TMf [2]. Zarówno dodatnie, jak i ujemne obwody regulacji aktywności endokrynej komórek Leydiga, w których biorą udział TMf, działają *via* komórka Sertoliego (rys. 1). Z jednej strony komórka Sertoliego ulega aktywacji przez FSH [8] i stymuluje *in situ* spermatogenezę. W wyniku tej aktywacji ulega wzmoczeniu produkcja inhibiny, która na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego hamuje aktywację komórek Sertoliego przez FSH [2]. Z drugiej strony komórka Sertoliego ma receptor dla TNF- α i reaguje na tę monokinę wydzielaną przez TMf pobudzeniem spermatogenezy, co jednocześnie hamuje zarówno produkcję inhibiny, jak i aktywność endokrynną komórek Leydiga aktywowanych LH [2,78].

Niektórzy badacze dopatrują się istnienia w TMf swoistego systemu transportu peptydów, które mogłyby parakrynowo regulować produkcję hormonów sterydowych przez komórki Leydiga [60]. Według innych TMf wydzielają czynnik zwany MDF (ang. *macrophage derived factor*) [29, 30] lub też niezidentyfikowany apolarny czynnik lipofilowy [34,50], który bezpośrednio aktywuje procesy steroidogenezy w komórkach Leydiga. Istotną rolę w pozytywnej regulacji endokrynej komórek Leydiga przez TMf odgrywa prawdopodobnie M-CSF (rys. 1). Brak wydzielania M-CSF przez TMf jest domniemaną przyczyną obniżenia poziomu testosteronu



RYSUNEK 1. Wpływ TMf na mechanizm wzajemnej regulacji aktywności sekrecyjnej komórek jądra, NN – czynnik niezidentyfikowany, pozostałe skróty objaśniono w tekście; \rightarrow regulacja pozytywna, \nrightarrow regulacja negatywna

u myszy osteoporotycznych, w czego następstwie wykazują one istotny spadek żywych plemników w nasieniu [10,11]. W stymulacji TMf do wydzielania czynników troficznych dla komórek Leydiga [43] biorą udział wewnątrzkomórkowe jony wapnia. Zwrócono również uwagę, że NO, potencjalnie uwalniany z TMf, odwracalnie hamuje steroidogenezę w komórkach Leydiga aktywowanych hCG [18]. Zahamowanie to jest wynikiem zablokowania aktywności cytochromu P450 odpowiedzialnego za utlenienie pierścienia cholesterolu do pregnenolonu [18].

Tak więc wpływ Tmf na rozwój komórek Leydiga i steroidogenezę jest mediowany bezpośrednio przez produkty sekrecji Tmf (TNF- α , M-CSF, NO, MDF, czynnik lipofilowy), a także pośrednio przez aktywację hormonalną osi przysadka-jądro (rys. 1).

Ten skomplikowany hormonalno-parakryny system regulacyjny *in vivo* może tłumaczyć odmienne wyniki badań uzyskiwanych na modelu *in vitro* [32]. W modelu *in vitro*, użycie izolowanych (niejednokrotnie w odmienny sposób) najczęściej dwóch populacji komórek, uniemożliwia pełną symulację wielu istotnych mechanizmów regulacyjnych zachodzących *in vivo*. W żywym organizmie zachowana jest nie tylko mozaika i architektura współpracujących ze sobą wielu typów komórek jądra, lecz także wpływ innych narządów i układów, w tym endokrynnego, na procesy metaboliczne w jądrze.

6. Tmf A KOMÓRKI SERTOLIEGO

Komórki Sertoliego zlokalizowane są na wewnętrznej prekolagenowej warstwie błony podstawnej kanalika nasieniotwórczego i wnikają do jego światła. Dzięki silnym zespoleniom jednolitej warstwy komórek, izolują one szczelnie strefę kanalików nasiennych od tkanki śródmiąższowej jądra [42] i nie dopuszczają do „przesączania” IgG [53]. Dzięki temu zabezpieczają przed rozwojem odpowiedzi immunologicznej w świetle kanalików nasiennych, z udziałem przeciwciał skierowanych przeciw komórkom mejotycznym i postmeiotycznym. Jednak w części przypodstawnej przeciwciała mogą docierać z płynem tkanki śródmiąższowej.

U ludzi i kilku przebadanych gatunków zwierząt (myszy, szczurów, baranów) komórki Sertoliego, podobnie jak komórki rozrodcze, nie wykazują ekspresji antygenów MHC klasy I i II [63], co odróżnia je od makrofagów. Charakteryzują się wysoką aktywnością fagocytarną i pochłaniają ciała reszkowe oraz degenerujący nabłonek plemnikotwórczy [74]. Nie mają natomiast receptorów dla trzeciego składnika dopełniacza (CR₃) oraz Fc γ RI i Fc γ RII/III [6] charakterystycznych dla makrofagów i odpowiedzialnych za fagocytozę immunologiczną. Komórki Sertoliego wykazują ekspresję antygeny CD95L (FasL), dzięki któremu indukują proces apoptozy w limfocytach rozpoznających autoantygen posiadających odpowiedni ligand (CD95) [2]. Również dzięki identycznym mechanizmom makrofagi, jako komórki prezentujące antygen, mogą indukować apoptozę limfocytów [48]. Ten mechanizm wygaszania odpowiedzi immunologicznej ma z pewnością niebagatelne znaczenie w utrzymaniu tolerancji na autoantygeny komórek szeregu spermatogenezy [28].

TNF- α produkowany przez Tmf stymuluje komórki Sertoliego wykazujące ekspresję receptorów dla TNF- α typu I i typu II [2] do produkcji czynników odżywczych dla plemników [2]. Komórki Sertoliego aktywnie wydzielają IL-1 α [64], TGF- α ,

TGF- β 1 TGF- β 2 [13] i IL-6 [74]. W komórkach Sertoliego wykazano wysoką aktywność syntazy PGE₂ [70] oraz obecność na błonie komórkowej integryny α 1 β 1 i α 9 β 1 odgrywających rolę w interakcjach z białkami macierzy pozakomórkowej [27]. Komórki Sertoliego u ludzi mają bezpośredni wpływ na regulację produkcji testosteronu przez wydzielanie insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1), który wzmacnia aktywność enzymów przemiany sterydowej w komórkach Leydiga (rys. 1) [44]. Aktywacja przez FSH komórek Sertoliego [8] powoduje wzmocnienie aktywności S-transferazy glutationu, która bezpośrednio pobudza aktywność spermatogenezy w kanalikach nasiennych [9]. Oprócz kooperacji komórek Sertoliego z komórkami Leydiga sugeruje się także wzajemne współdziałanie komórek Sertoliego i TMf. Współpraca tych ostatnich realizowana jest w zakresie:

- 1) utrzymania bariery immunologicznej w jądrach [2,30],
- 2) „tłumaczenia” sygnałów hormonalnych, np. FSH przez ekspresję i aktywację receptora FSH [8,9],
- 3) aktywacji enzymów, np. aktywacja inhibitora plazminogenu przez TNF- α [45] oraz
- 4) przez bezpośredni wpływ TMf i komórek Sertoliego na dojrzewanie komórek plemnikotwórczych [9,70].

7. AKTYWNOŚĆ WYDZIELNICZA MAKROFAGÓW GONAD MĘSKICH

Produkty sekrecji komórek linii monocyt/makrofag, w zależności od lokalizacji narządowej, mogą regulować funkcje hepatocytów, depolaryzować błonę miocytów, wpływać na wzrost i sekrecję osteoblastów, wpływać na tworzenie kolonii alveolarnych II typu, na proliferację komórek mezangium (tkanki łącznej kłęбка nerkowego), astrogleju i fibroblastów [32,71,72]. TMf wytwarzają wiele białek odmiennych od produkowanych przez makrofagi otrzewnowe [32]. Spośród około 100 przebadanych substancji białkowych lub ich podjednostek jedynie połowa z nich była identyczna dla obu typów komórek. Ponad połowę całkowitej ilości białka wydzielanego przez TMf stanowi proteina o nieznannej funkcji [32]. TMf wydzielają anion ponadtlenkowy i lizozym [32], które biorą udział w nieswoistych mechanizmach obronnych u różnych gatunków, choć w ilościach kilkukrotnie mniejszych niż makrofagi płucne czy otrzewnowe. Niewielkie zdolności sekrecyjne TMf są wyrazem braku ich aktywacji w odizolowanej od antygenów zewnątrzpochodnych tkance jądra. Wiele białek wytwarzanych przez TMf ma działanie regulacyjne w stosunku do samych komórek jądra – komórek Sertoliego i Leydiga.

8. CYTOKINY I CZYNNIKI SEKRECYJNE TMf

Czynnik martwicy nowotworu typ alfa – TNF- α

In vitro TMf produkują TNF- α jedynie po izolacji z użyciem kolagenazy [32], natomiast przy izolacji nieenzymatycznej wydzielają go dopiero po stymulacji LPS. TNF- α jest nieobecny w płynie śródmiąższowym, jakkolwiek w TMf wykazano obecność informacyjnego RNA (mRNA) [16,78], co może wskazywać na jego niską produkcję i akumulację. Sugerowano, że TMf nie wytwarzają klasycznej formy TNF- α , lecz czynnik podobny do TNF- α (*TNF-like factor*), gdyż przeciwciała anty TNF- α lub anty TNF- β nie neutralizowały jego cytotoksyczności w stosunku do linii L-929, używanej standardowo do oznaczania aktywności cytotoksycznej dla obu form TNF. Ponieważ jego wytwarzanie stymulowane jest przez LPS, może on być parakrynnym czynnikiem regulacyjnym produkcji hormonów płciowych w jądrach w warunkach patologicznych [56]. Początkowo sądzono, że TNF- α aktywuje komórki Leydiga i stymuluje zarówno podstawowe wydzielanie testosteronu, jak i jego wydzielanie indukowane przez hCG. Dziś wiadomo, że wpływ ten jest hamujący [51,78] i ma charakter pośredni. Hamujący wpływ TNF- α na steroidogenezę komórek Leydiga zachodzi przez komórki Sertoliego [2,8,44,70], których lokalizacja w kanalikach nasiennych jądra uprzywilejowała do sprawowania kontroli nad procesem spermatogenezy [9,44].

Interleukina 1

TMf szczurów wytwarzają bioaktywną monokinę IL-1, głównie jej formę α , w ilości kilkadziesiąt razy mniejszej niż makrofagi otrzewnowe [1,29]. Natomiast komórki Leydiga są producentami IL-1 β [3,41,70]. Również komórki Sertoliego wydzielają lub spichrzają IL-1 α [64]. Podczas gdy forma β jest w całości przeznaczona na eksport, forma α jest również przechowywana wewnątrz komórek albo występuje w postaci związanej z ich powierzchnią.

Tak IL-1 α , jak i IL-1 β hamują u szczurów wpływ hCG na uwalnianie testosteronu przez komórki Leydiga. Wynika to z faktu podobnego działania biologicznego tych cytokin [32] oraz ze względu na przekazywanie sygnału za pośrednictwem tego samego receptora IL-1RI. Drugi receptor IL-1RII, wiąże z wyższym powinowactwem IL-1 β niż IL-1 α , ale nie przenosi sygnału do wnętrza komórki. Późniejsze doniesienia dowodzą obecności w jądrach mysich receptora IL-1RI, o wyższym powinowactwie dla IL-1 α i o niższym dla IL-1 β [75].

IL-1 może wpływać na komórki kanalików nasiennych, gdyż przenika ona przez barierę krew-jądro około sześciokrotnie wydajniej niż albumina. IL-1 α jest naturalnym stymulatorem podziałów spermatogonii i wzmacnia podstawową produkcję testosteronu w komórkach Leydiga [32].

IL-1 β wpływa parakrynowo na aktywność steroidogenezy w komórkach Leydiga, przy czym efekt ten jest odwrotnie proporcjonalny do koncentracji testosteronu. IL-1 β stymuluje syntezę DNA w niedojrzałych komórkach Leydiga *in vitro*, co może mieć związek ze wzrostem liczby tych komórek przed osiągnięciem dojrzałości płciowej [40], choć zdania w kwestii wpływu IL-1 na komórki Leydiga są podzielone [73].

Inne cytokiny (GM-CSF, IL-6, M-CSF)

Niestymulowane TMf produkują kilkukrotnie więcej GM-CSF niż makrofagi otrzewnej [39]. Pobudzenie LPS zwiększa wydzielanie cytokin (IL-1, TNF- α i IL-6) natomiast znacznie hamuje sekrecję GM-CSF. Efekt wzmożenia syntezy cytokin uzyskiwano dopiero po łącznym zastosowaniu IFN- γ , LPS i indometacyny, co sugerować może fizjologiczny stan wygaszenia aktywności wydzielniczej cytokin w TMf przy udziale prostaglandyn. Nie obserwowano aktywności sekrecyjnej IL-6 przez TMf z populacji niestymulowanej, a jedynie po stymulacji LPS [1]. Po stymulacji wirusem Sendai zarówno TMf, jak i komórki Leydiga produkowały IFN typu I (IFN- α i IFN- β) [17]. Zatem TMf ulegają aktywacji sekrecyjnej w zapaleniu bakteryjnym (LPS) lub wirusowym. W zakażeniu wirusowym IFN- γ pojawiać się może jako efekt napływu limfocytów do ogniska zapalnego, natomiast produkcja IL-6 (dawniej zwaną IFN- β_2) może być wynikiem pobudzenia do sekrecji TMf tkanki śródmiąższowej jądra. Wydzielanie IFN- α i IL-6 jest charakterystyczne dla ostatecznie zróżnicowanej nie proliferującej formy Mf [76].

Prostaglandyny

TMf hamują proliferację limfocytów krwi obwodowej zarówno przy ich bezpośrednim kontakcie, jak i przy użyciu nadsącza z hodowli izolowanych TMf [38]. Aktywność supresyjna związana jest z obecnością w nadsącza prostaglandyn PGE₂ i PGF_{2 α} . Inhibitor cyklooksygenazy – indometacyna przywraca aktywność proliferacyjną limfocytów zahamowaną w obecności TMf.

Inne czynniki wytwarzane przez TMf

Proopiomelanokortyna (POMC), prekursor β -endorfiny i hormonu adrenokortykotropowego, jest obecna w ekstraktach z jąder, płynie śródmiąższowym, komórkach Leydiga [21] oraz TMf [46]. Na poziom POMC i jej m-RNA nie wpływa dwumetanosulfoetan (EDS), który działa toksycznie na komórki Leydiga [22]. Opisano również, produkowany przez TMf, czynnik oporny na niskie pH, nie będący ani IL-1, TNF- α czy TGF- β , który hamuje produkcję testosteronu w komórkach Leydiga u szczurów [32]. Donoszono także o uwalnianym z TMf lipofilnym czynnikiem wielokrotnie wzmagającym sekrecję testosteronu przez komórki Leydiga [33]. Nasze

niepublikowane badania wykazały, że TMf produkują TGF- β . Wszystkie dotychczasowe doniesienia wskazują na udział różnych czynników parakrynych w oddziaływaniu międzykomórkowe w jądrach. Konieczne są jednak dodatkowe badania dla określenia ich struktury molekularnej i znaczenia fizjologicznego.

9. HORMONY GONADOTROPOWE

Wpływ hormonu folikulotropowego (FSH) na TMf

U zwierząt z usuniętą przysadką, podany dojądrowo FSH, znakowany radioizotopem, deponowany jest na powierzchni TMf oraz w dużej ilości w ich lizosomach i cytoplazmie [32]. Wskazuje to, że TMf mają zdolność do nieswoistego spichrzania FSH z tkanki śródmiąższowej drogą endocytozy. Sugerowano także, że TMf ludzi [32] i różnych gatunków zwierząt (myszy, szczurów, chomików) [23,32,52] posiadają swoisty receptor dla FSH o wysokim powinowactwie, ale małej pojemności [32], którego aktywacja miała powodować zmiany metaboliczne TMf (zwiększenie poziomu cAMP, mleczanu, nasilenie procesu transkrypcji i translacji) [32]. W przyjęciu takiego założenia posłużono się pewną analogią, gdyż na wielu komórkach, w tym na Mf i na limfocytach, stwierdzono obecność receptorów dla różnorodnych hormonów, w tym dla neurohormonów [32]. Obecnie uważa się, że spośród komórek jądra, mRNA dla receptora FSH mają tylko komórki Sertoliego [8], a wpływ FSH na metabolizm TMf jest wyrazem pośredniego wpływu komórek Sertoliego na ich aktywność.

Wszystkie powyższe doniesienia potwierdzają jednak tezę o powiązaniu układu immuno-endokrynnego, są także dowodem wzajemnego wpływu i kontroli aktywności na zasadzie sprzężeń zwrotnych zachodzących między poszczególnymi typami komórek tkanki jądra (TMf, komórki Sertoliego i komórki Leydiga).

Wpływ gonadotropiny kosmówkowej ludzkiej (hCG) na TMf

Wpływ hCG na TMf jest dyskusyjny, a uzyskiwane wyniki są rozbieżne. Dominuje jednak pogląd o stymulującym wpływie hCG na liczebność TMf i komórek Leydiga w jądrach [32]. Efekt ten jest bardziej wyrazisty we wnętrzu, przy czym wpływ tego hormonu na TMf jest pośredni, przez komórki Leydiga. Wskazuje na to fakt, że po zastosowaniu *in vivo* kwasu kłodronowego, który eliminuje komórki Leydiga, hCG nie wpływa na zwiększenie liczby TMf w porównaniu z jądrem zwierząt kontrolnych [23]. Ludzka gonadotropina kosmówkowa zwiększa liczbę TMf w jądrach od okresu noworodkowego aż do czasu osiągnięcia dojrzałości płciowej [65]. Istnieją jednak doniesienia nie wykazujące wpływu hCG na wielkość populacji TMf [32].

Wpływ innych hormonów na TMf

Hormon wzrostu (GH) jak też prolaktyna (LTH) wpływają istotnie na zwiększenie liczby i wielkości TMf i wzmagają właściwości fagocytarne tych komórek [23]. Nie określono jednak, czy jest to efekt pośredniego czy bezpośredniego działania LTH na TMf [19]. Zarówno TMf, jak i nadsącz z ich hodowli hamują indukowaną przez hormon luteinizujący (LH) produkcję testosteronu przez komórki Leydiga, lecz nie hamują podstawowego wydzielania testosteronu. Zahamowanie to jest prawdopodobnie wynikiem zaburzenia transportu cholesterolu do mitochondriów komórek Leydiga jeszcze przed utworzeniem pregnenolonu [73].

Wielkość populacji Mf jest regulowana przez hCG i LH prawdopodobnie za pośrednictwem innych substancji niż androgeny wydzielane przez komórki Leydiga, np. czynników angiogennych [12]. Sugeruje się udział TMf w sekrecji NO i regulacji osi przysadka-jądro [26]. Dootrzewnowe lub dojadrowe podanie egzogenego substratu dla iNOS (indukowanej syntazy NO) estru metylowego L-argininy, powoduje spadek poziomu LH i testosteronu we krwi i w płynie tkanki śródmiąższowej jąder, a efekt ten nie występuje u myszy pozbawionych TMf [26].

10. METABOLIZM STERYDÓW

Wykazywano aktywność metaboliczną makrofagów wielu gatunków w przemianie sterydów [32]. Istnieją jednak doniesienia negujące udział TMf w metabolizmie testosteronu [73].

Działanie steroidów

Estrogeny [32], w przeciwieństwie do testosteronu [59], wpływają na zwiększenie aktywności fagocytarnej, produkcję IL-1 i ekspresję antygenów MHC klasy II przez TMf [32]. Dihydrotestosteron hamuje produkcję IL-6 przez TMf, a także wytwarzanie IFN- γ przez aktywowane limfocyty cytotoksyczne *in vitro* [59]. Testosteron nie ma wpływu na liczebność TMf w tkance śródmiąższowej jądra [32], gdyż ani antyandrogeny, ani blokery testosteronu nie hamują naturalnego przyrostu liczby makrofagów między 20. a 30. dniem po urodzeniu.

11. WPŁYW USUNIĘCIA PRZYSADKI

Oprócz zmian bezpośrednio związanych z usunięciem przysadki, spowodowanych brakiem hormonów tropowych, po hypofyzektomii pojawiają się zmiany pośrednie

w postaci ogólnoustrojowego upośledzenia metabolizmu. W jądrze obserwowano zmiany w morfologii i funkcji TMf – zmniejszeniu ulega całkowita objętość tkanki jądra, jak również liczby TMf [19]. U szczurów poddanych wycięciu przysadki podawanie FSH, LH i prolaktyny (lecz nie GH) powoduje ilościowy przyrost TMf [19]. Przeciwciała antygonadotropowe wywołują u szczurów istotny spadek liczby TMf (o 68%) i stosunkowo niewielkie obniżenie liczby komórek Leydiga (o 18%) ze zmianą prawidłowego stosunku komórek Leydiga do TMf z 4:1 na 9:1 [20]. Uważa się, że aktywność oksydazowa glutationu w TMf spada po zabiegu usunięcia przysadki i można ją przywrócić stosując podawanie gonadotropiny. Wszystkie powyższe badania potwierdzają wpływ hormonów przysadki (FSH, LH i prolaktyny) na rozwój TMf [32].

12. WPŁYW SEZONOWYCH RYTMÓW BIOLOGICZNYCH

Zaobserwowano gatunkowo-specyficzne różnice w zdolności do produkcji nasienia w zależności od okresu długiego czy krótkiego dnia. Ilość komórek Sertoliego pozostaje stała, ale liczba i wielkość TMf ulega sezonowym zmianom. Zarówno u chomików, jak i nietoperzy w okresie dnia krótkiego liczba TMf stanowi 70% ich liczby w okresie dnia długiego [32].

TMf ptaków lokalizują się w odmiennych strukturach jądra w okresie obniżenia aktywności reprodukcyjnej w związku ze zmianami pór roku. U łabędzi obserwowano przemieszczanie się TMf z tkanki śródmiaższowej do kanalików nasiennych w okresie dnia krótkiego, co sugerowało ich aktywność w usuwaniu zdegradowanych komórek spermatoidalnych [52]. U ssaków tylko w warunkach chorobowych (AIDS) lub w mutacjach genetycznych TMf występują w kanalikach nasiennych [32], natomiast w warunkach fizjologicznych funkcję usuwania debris tkankowego spełniają komórki Sertoliego.

13. BARIERA KREW-JĄDRO

Komórki tkanki śródmiaższowej jądra wraz z komórkami Sertoliego tworzą specyficzne mikrośrodowisko jądra, które stanowi „narząd uprzywilejowany immunologicznie”. Uprzywilejowanie to warunkuje tzw. bariera krew-jądro [69], której zadaniem jest izolacja antygenów powstających w procesie spermatogenezy [69], na które, ze względu na późne pojawienie się w ontogenezie, nie wytwarza się w ustroju stan tolerancji immunologicznej. Pierwsze sugestie na temat istnienia bariery krew-jądro wysunięto, gdy barwnik podany dożylnie nie wybarwił komórek

wewnątrz kanalika nasiennego, podczas gdy inne narządy, poza mózgiem, były nim wybarwione. Bariera krew - jądro nie istnieje przed okresem dojrzałości płciowej.

Bariera krew-jądro składa się z kilku poziomów anatomicznych i/lub funkcjonalnych.

1. Selektywnie przepuszczalny śródbłonek naczyń krwionośnych pozwala jedynie na przesącz zawierający 1% białka, zwany płynem śródmiąższowym [62]. Ta selektywna przepuszczalność śródbłonka regulowana jest w drodze hormonalnej przez gonadotropinę kosmówkową (hCG), hormon luteinizujący (LH) i serotoninę [69]. W warunkach patologicznych, np. w alergicznym zapaleniu jąder, mediatory ostrego stanu zapalnego wzmagają przepuszczalność, co w konsekwencji prowadzi do pojawienia się wysięku zawierającego przeciwciała IgG1, 2 i 3, IgM i IgA oraz liczne limfocyty [14]. Zatem bariera krew-jądro warunkowana jest odpowiednim mikrokrążeniem krwi w jądrach, regulowanym czynnikami hormonalnymi, parakrynnymi i zapalnymi [14]. W warunkach prawidłowych TMf posiadają aktywność supresyjną poprzez wydzielane eikozanoidy (PGE₂ i PGF₂α) [38] oraz monokiny supresyjne TGF-β i IL-10 [5].
2. Mechanizm ograniczający napływ limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ sprawia, że bardzo niewiele limfocytów przekracza barierę śródbłonka kapilar jądrowych i migruje fizjologicznie do tkanki śródmiąższowej [31, 63], podczas gdy duża liczba limfocytów dociera do torebki łączno-tkankowej jądra. Sugeruje to, że śródbłonek naczyń torebki stanowi barierę bardziej szczelną dla limfocytów niż kapilary śródmiąższowe jądra. W alergicznym zapaleniu jąder potwierdza to zróżnicowany transport immunoglobulin w tych dwóch miejscach [80].
3. Trzecim elementem tworzącym barierę krew-jądro jest trójwarstwowa struktura kanalika nasiennego zbudowanego z warstwy fibroblastów i komórek mioidalnych, prekolagenowej warstwy wewnętrznej oraz ściśle przylegających i łączonych komórek Sertoliego [62]. Bariera ta w niewielkim stopniu przepuszcza albuminę, a bardziej efektywnie białka o niższej masie molowej, np. cytokiny IL-1 [2] i GM-CSF [53]. Niektóre antygeny spermatogonii typu A i preleptotenowych spermatocytów występują także na komórkach Sertoliego [80] lub też ulegają przesączaniu na zewnątrz kanalików prostych i są prezentowane przez TMf MHCII-pozytywne, co w konsekwencji może prowadzić do powstania auto-przeciwciał. Istnieje szereg mechanizmów, które mogą wyhamować potencjalną zdolność prezentacji autoantygenów komórek rozrodczych przez TMf [80] (patrz rozdz. TMf a komórki Sertoliego).

Immunologiczne uprzywilejowanie jąder manifestuje się również dłuższym okresem odrzucania skórnych dojądrowych przeszczepów heterotopowych (czyli wykonanych do miejsca nierównoważnego anatomicznie), nawet ksenogenicznych, niż w innych tradycyjnych miejscach przeszczepiania [61,69]. Dłuższe przeżycie przeszczepu dojądrowego obserwowano także w przypadku wnętrza [68]. Brak od-

rzucania przeszczepu nie wynika z wewnątrzjądrowej niewydolności fazy wykonawczej (eferentnej), bo immunizacja wstępna przeszczepem ortotopowym (skóry) daje dobrą odpowiedź odrzucenia homologicznego przeszczepu w jądrze. Mechanizm opóźnionego odrzucania przeszczepu w jądrze nie jest znany, wykazano jednak brak wpływu testosteronu na jego przetrwanie i przeżywalność [68]. Wydaje się prawdopodobne, że istotną rolę może tu odgrywać obecność innych bliżej niezidentyfikowanych czynników immunosupresyjnych, np. protektyny, która pojawia się w jądrach dopiero w okresie dojrzałości płciowej [64].

14. CHOROBY AUTOIMMUNIZACYJNE JĄDER

Immunizacja homogenatem izologicznych jąder indukuje powstanie alergicznego zapalenia jąder [80]. Zmiany, które są wynikiem autoagresji, zwykle obejmują nacieczenie tkanki śródmiąższowej przez granulocyty, makrofagi i limfocyty. W warunkach fizjologicznych tylko TMf znajdujące się w bezpośrednim kontakcie z kanalikami nasiennymi prostymi wykazują pozytywną ekspresję MHC klasy II [55,58]. Natomiast TMf zlokalizowane w tkance śródmiąższowej z innych części jądra stają się MHC klasy II pozytywne dopiero po immunizacji homogenatem jądra z kompletnym adjuwantem Freuda (FCA) [80]. To wzmożenie ekspresji antygenów MHC klasy II można wyhamować przez podanie przeciwciał anty IFN- γ [32].

Eksperymentalne, alergiczne zapalenie jąder można przenieść na „naiwnych” (nieuczulonych) biorców przy pomocy limfocytów CD4⁺ dawców uczulonych homogenatem z jąder [80]. O ile jednak aktywne uczulenie wywołuje zmiany zapalne w całej objętości jąder, to biorny transfer uczulonych limfocytów CD4⁺ powoduje u biorców zmiany w jądrach wyłącznie wokół kanalików prostych, gdzie zlokalizowane są TMf mające antygeny MHC klasy II [32]. Przyczyna tej charakterystycznej lokalizacji związana jest z fizjologicznie istniejącym przesączaniem na zewnątrz kanalików prostych antygenów komórek rozrodczych. U przyszłego dawcy limfocytów, na skutek domięśniowego podania homogenatu jądra w FCA, pojawia się stan autoimmunizacji na antygeny komórek rozrodczych. U biorcy limfocyty tego dawcy, (uczulone limfocyty CD4⁺) rozpoznają antygeny prezentowane przez MHC klasy II pozytywne TMf [80], co w efekcie prowadzi do charakterystycznych zmian zapalnych jądra.

Struktura i funkcja jąder warunkuje złożoność procesów regulacyjnych zachodzących pomiędzy różnymi typami komórek tego narządu. Procesy te regulowane są zwrotnie w obrębie tkanki jądra zarówno w sposób bezpośredni przez kontakt komórek, jak i pośredni za pomocą wytwarzanych mediatorów. Wpływają na nie także hormony regulacyjnej osi przysadka-jądro, których receptory występują na

różnych, lecz wzajemnie funkcjonalnie powiązanych komórkach jądra. Wyjaśnienie tej złożonej regulacji może pozwolić na rozwiązanie problemów dotyczących cytoarchitektury i fizjologii męskich gruczołów płciowych.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować Panu Prof. Włodzimierzowi Ptakowi za krytyczny i wyczerpujący komentarz do pierwszej wersji tekstu i Pani Prof. Barbarze Płytycz za uwagi dotyczące tego artykułu.

LITERATURA

- [1] AFANE M, DUBOST JJ, SAUVEZIE B, ISSOUAL D, DOSGLIBERT A, GRIZARD G, BOUCHER D. Modulation of Leydig cells testosterone production by secretory products of macrophages. *Andrologia* 1998; **30**: 71–78.
- [2] BENAHMED M. Role du tumor necrosis factor dans la gonade male. *Contracept Fertil Sex* 1997; **25**: 569–571.
- [3] BILIŃSKA B, KOZIEŁ E, KMICIKIEWICZ I. Interaction between voles/mice Leydig cells and macrophages. Cyto- and immunocytochemical approach. *Centr Eur J Immunol* 1998; **23**: 106–115.
- [4] BRIGHAM DE, LITTLE G, LUKYANENKO YO, HUTSON JC. Effects of clodronate-containing liposomes on testicular macrophages and Leydig cells *in vitro*. *J Endocrinol* 1997; **155**: 87–92.
- [5] BRYNIARSKI K, SZCZEPANIK M, BOBEK M, PTAK W. Aktywność biologiczna makrofagów jądrowych u myszy. Materiały zjazdu IX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 1998: 175.
- [6] BRYNIARSKI K, SZEWCZYK K, SZCZEPANIK M, BOBEK M, NOWAK B. Aktywność biologiczna makrofagów jądrowych u myszy. Metody izolacji. Materiały zjazdu ogólnopolskiego sympozjum: Immunologia Rozrodu. Łódź – Instytut CZMP 1999: 31.
- [7] BRYNIARSKI K, SZEWCZYK K, SZCZEPANIK M, BOBEK M, NOWAK B, REZNER W, BUKOWCZAN M, ODOBINA R, GRZESIAK A, WIETCHY T. Aktywność biologiczna makrofagów jądrowych u myszy. Badanie aktywności prezentacji antygeny w odpowiedzi humoralnej. Materiały zjazdu ogólnopolskiego sympozjum Immunologia Rozrodu. Łódź – Instytut CZMP 1999: 32.
- [8] CARPENTER AM, LUKYANENKO YO, LEE VH, HUTSON JC. FSH does not directly influence testicular macrophages. *J Androl* 1998; **19**: 420–427.
- [9] CASTELLON EA. Influence of age, hormones and germ cells on glutathione s-transferase activity in Sertoli cells. *Int J Androl* 1999; **22**: 49–55.
- [10] COHEN PE, CHISHOLM O, ARCECI RJ, STANLEY ER, POLLARD JW. Absence of colony-stimulating factor-1 in osteoporotic (csfmop/csfmop) mice results in male fertility defects. *Biol Reprod* 1996; **55**: 310–317.
- [11] COHEN PE, NISHIMURA K, ZHU L, POLLARD JW. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 765–772.
- [12] COLLIN O, BERGH A. Leydig cells secrete factors with increase vascular permeability and endothelial cell proliferation. *Int J Androl* 1996; **19**: 221–228.

- [13] CUPP AS, KIM G, SKINNER MK. Expression and function of Transforming Growth Factor Beta (TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3) during embryonic rat testis development. *Biol Reprod* 1999; **60**: 1304–1313.
- [14] DAMBER JE, BERGH A. Testicular microcirculation – a forgotten essential in andrology? *Int J Androl* 1992; **15**: 285–292.
- [15] DAVIDOFF MS, SCHULZE W, MIDDENDORFF R, HOLSTEIN AF. The Leydig cells in the human testis – a new member of diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res* 1993; **271**: 429–439.
- [16] DE SK, CHEN H, PACE JL, HUNT JS, TERRANOVA PF, ENDERS GC. Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 1993; **133**: 386–396.
- [17] DEJUCQ N, LIENARD MO, GUILLAUME E, DORVAL I, JEGOU B. Expression of intergerons alpha and gamma in testicular interstitial tissue and spermatogonia of the rat. *Endocrinology* 1998; **139**: 3081–3087.
- [18] DEL PUNTA K, SANCHEZ-RUIZ ME, PIGNATARO OP. Regulacion de la esteroidogenesis testicular por oxido nitrico. *Medicina B Aires* 1997; **57**: 337–340.
- [19] DOMBROWICZ D, SENTE B, RERTER E, CLOSSET J, HENNEN G. Pituitary control of the proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. *J Androl* 1996; **17**: 639–650.
- [20] DUCKETT RJ, HEDGER MP, MCLACHLAN RI, WERFORD NG. The effect of gonadotropin-releasing hormone immunization and recombinant follicle-stimulating hormone on the Leydig cell and macrophage population in the adult rat testis. *J Androl* 1997; **18**: 417–423.
- [21] ESKELAND NL, LUGO DI, PINTAR JE, SCHACHTER BS. Regulation of β -endorfin secretion by corticotropin-releasing factor in the intact rat testis. *Endocrinology* 1989; **124**: 2914–2919.
- [22] GAYTAN F, BELLIDO C, AGUILAR E, VAN ROOIJEN N. Pituitary-testis axis in rats lacking testicular macrophages. *Eur J Endocrin* 1995; **132**: 218–222.
- [23] GAYTAN F, BELLIDO C, AGUILAR E, VAN ROOIJEN N, AGUILAR E. Role of testicular macrophages in the response of Leydig cells to gonadotropins in young hypophysectomised rats. *J Endocrinol* 1995; **147**: 463–471.
- [24] GAYTAN F, BELLIDO C, MORALES C, REYMUNDO C, AGUILAR E, VAN ROOIJEN N. Response to Leydig cell apoptosis in the absence of testicular macrophages. *J Reprod Immunol* 1995; **29**: 81–94.
- [25] GAYTAN F, BELLIDO C, MORALES C, GARCIA M, VAN ROOIJEN N, AGUILAR E. *In vivo* manipulation (depletion versus activation) of testicular macrophages: central and local effects. *J Endocrinol* 1996; **150**: 57–65.
- [26] GAYTAN F, BELLIDO C, AGUILAR R, MORALES C, VAN ROOIJEN N, AGUILAR E. Role of testis response of the pituitary-testicular axis to nitric oxide-related agents. *Eur J Endocrinol* 1997; **137**: 301–308.
- [27] GIEBEL J, LOSTER K, RUNE GM. Localization of integrin β 1, α 5, and α 9 subunits in the rat testis. *Int J Androl* 1997; **20**: 3–9.
- [28] GRIFFITH TS, FERGUSON TA. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Tod* 1997; **18**: 240–244.
- [29] HAYES R, CHALMERS SA, NIKOLIC-PATERSON DJ, ATKINS RC, HEDGER MP. Secretion of bioactive interleukin 1 by rat macrophages *in vitro*. *J Androl* 1996; **17**: 41–49.
- [30] HEDGER MP. Testicular leukocytes: what they are doing? *Rev Reprod* 1997; **2**: 38–47.
- [31] HEDGER MP, WANG J, LAN HY, ATKINS RC, WREFORD NG. Immunoregulatory activity in adult rat testicular interstitial fluid: relationship with intratesticular CD8⁺ lymphocytes following treatment with ethan dimethane sulfonate and testosterone implants. *Biol Reprod* 1998; **58**: 935–942.
- [32] HUTSON JC. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol* 1994; **149**: 99–143.

- [33] HUTSON JC, GARNER CW, DORIS PA. Purification of lipophilic factor from testicular macrophages that stimulates testosterone production by Leydig cells. *J Androl* 1996; **17**: 502–508.
- [34] HUTSON JC. Interaction between testicular macrophages and Leydig cells. *J Androl* 1998; **19**: 394–398.
- [35] ITOH M, DE ROOIJ DG, JANSEN A, DREXHAGE HA. Phenotypical heterogeneity of testicular macrophages / dendritic cells in normal adult mice: an immunohistochemical study. *J Reprod Immunol* 1995; **28**: 217–232.
- [36] ITOH M, UENO M, LI XO, SATRIOTOMO I, TAKEUCHI Y. Topographical uptake of blood-borne horseradish peroxidase (HRP) in the murine testis at the light microscopic level. *Int J Androl* 1998; **21**: 74–80.
- [37] JOHNSTON RB. Monocytes and macrophages. *N Eng J Med* 1988; **318**: 747–752.
- [38] KERN S, MADDOCKS S. Indomethacin blocks the immunosuppressive activity of rat testicular macrophages cultured *in vitro*. *J Reprod Immunol* 1995; **28**: 189–201.
- [39] KERN S, ROBERTSON SA, MAU VJ, MADDOCKS S. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod* 1995; **53**: 1407–1416.
- [40] KHAN SA, KHAN SJ, DORRINGTON JH. Interleukin-1 stimulates deoksyribonucleic acid synthesis in immature Leydig cells *in vitro*. *Endocrinology* 1992; **131**: 1835–1857.
- [41] KMICIKIEWICZ I, BILIŃSKA B. Immunocytochemical localization of interleukin-1 (IL-1) in testicular macrophages and Leydig cells of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*, S.). *Folia Histochem Cytobiol* 1997; **35**: 93–94.
- [42] KOMENDER A. Układ płciowy męski. W pracy zbiorowej pod red. K. Ostrowskiego: Histologia. PZWL Warszawa 1988: 561–590.
- [43] KOZIEŁ E, FILIPIAK K, BUTOWSKA W, BILIŃSKA B, WARCHOŁ JB. Badanie immuno-endokrynnych zależności w gonadzie męskiej: udział jonów wapnia w stymulacji komórek Leydiga *in vitro*. *Ginekol Pol* 1998; **69**: 441–445.
- [44] LEJEUNE H, SANCHEZ P, SAEZ JM. Enhancement of long-term testosterone secretion and steroidogenic enzyme expression in human Leydig cells by co-culture with Sertoli cell-enriched preparations. *Int J Androl* 1998; **21**: 129–140.
- [45] LE MAGUERSSSE-BATTISTINI B, PERNOD G, KOLODIE L, MORERA AM, BENAHEMED M. Tumor necrosis factor-alpha regulates plasminogen activator inhibitor 1 in rat testicular peritubular cells. *Endocrinology* 1997; **138**: 1097–1105.
- [46] LI H, HEDGER MP, CLEMENTS JA, RISBRIDGER GP. Localization of immunoreactive β -endorphin and adrenocorticotrophic hormone and pro-opiomelanocortin mRNA to rat testicular interstitial tissue macrophages. *Biol Reprod* 1991; **45**: 282–289.
- [47] LI XQ, ITOH M, YANO A, MIYAMOTO K, TATEUCHI Y. Immunohistochemical detection of testicular macrophages during the postnatal maturation in the mouse. *Int J Androl* 1998; **21**: 370–376.
- [48] LINDHOUT E, KOOPMAN G, PALS ST, DE GROOT C. Triple check of antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol Tod* 1997; **18**: 573–577.
- [49] LOMBARD-VIGNON N, GRIZARD G, BOUCHER D. Influence of rat testicular macrophages on Leydig cells function *in vitro*. *Int J Androl* 1991; **15**: 144–159.
- [50] LUKYANENKO YO, CARPENTER AM, BRIGHAM D, HUTSON JC. Regulation of Leydig cells through StAR-independent pathway by a lipophilic factor from macrophages. *J Endocrinol* 1998; **158**: 267–275.
- [51] MAUDUIT C, HARTMANN DJ, CHAUVIN MA, REVOL A, MORERA AM, BENAHEMED M. Interleukin-1 α as a potent inhibitor of gonadotropin action in porcine Leydig cells: Site(s) of action. *Endocrinology* 1991; **129**: 2933–2940.
- [52] MAYERHOFER D, MAYERHOFER A, BARTKE A. Isolation and culture of testicular macrophages from a seasonally breeding species, *Phodopus sungorus*. Evidence for functional

- differences between macrophages from active and regressed testes. *Int J Androl* 1992; **15**: 263–281.
- [53] MCLAY RN, BANKS WA, KASTIN AJ. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor crosses the blood-testis barrier in mice. *Biol Reprod* 1997; **57**: 822–826.
- [54] MEINHARDT A, BACHER M, METZ C, BUCALA R, WREFORD N, LAN H, ATKINS R, HEDGER M. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol Reprod* 1998; **59**: 371–378.
- [55] MILLER SC, BOWMAN BM, ROBERTS LK. Identification and characterization of mononuclear phagocytes isolated from rat testicular tissues. *J Leukoc Biol* 1984; **36**: 679–687.
- [56] MOORE C, HUTSON JC. Physiological relevance of tumor necrosis factor secretion in mediating macrophage – Leydig cell interactions. *Endocrinology* 1994; **134**: 63–69.
- [57] NAITO M, UMEDA S, YAMAMOTO T, MORIYAMA H, UMEZU H, HASEGAWA G, USUDA H, SHULTZ LD, TAKAHASHI K. Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukoc Biol* 1996; **59**: 133–138.
- [58] NIEMI M, SHARPE RM, BROWN WRA. Macrophages in interstitial tissue of rat testis. *Cell Tissue Res* 1986; **243**: 337–344.
- [59] OLSEN NJ, KOVACS WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocrine Rev* 1996; **17**: 369–384.
- [60] OTTO C, BAUER K. Dipeptide uptake: a novel marker for testicular and ovarian macrophages. *Anat Rec* 1996; **245**: 662–667.
- [61] PARREIRA GG, OGAWA T, AVARBOCK MR, FRANCA LR, BRINSTER RL, RUSSEL LD: Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod* 1998; **59**: 1360–1370.
- [62] PLOEN L, SETCHELL BP. Blood-testis barriers revisited a homage to Lennart Nicander. *Int J Androl* 1992; **15**: 1–4.
- [63] POLLANEN P, NIEMI M. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int J Androl* 1987; **10**: 37–42.
- [64] POLLANEN P, VON EULER M, SODER O. Testicular immunoregulatory factors. *J Reprod Immunol* 1990; **18**: 51–76.
- [65] RABURN DJ, COQUELIN A, REIHART AJ, HUTSON JC. Regulation of macrophage population in postnatal rat testis. *J Reprod Immunol* 1993; **24**: 139–151.
- [66] RUTHERFORD MS, WITSELL A, SCHOOK LB. Mechanism generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leuk Biol* 1993; **53**: 602–618.
- [67] SEILER P, WENZEL I, WAGENFELD A, YEUNG CH, NIESCHLAG E, COOPER TG. The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and temporal expression of macrophage antigens. *Int J Androl* 1998; **21**: 217–226.
- [68] SELAVRY HR, WHITTINGTON K. Prolonged intratesticular islet allograft survival is not dependent on local steroidogenesis. *Horm Metab Res* 1988; **20**: 562–565.
- [69] SETCHELL BP, UKSILA J, MADDOCKS S, POLLANEN P. Testis physiology relevant to immunoregulation. *J Reprod Immunol* 1990; **18**: 19–32.
- [70] SORRENTINO C, SILVESTRINI B, BRAGHIROLI L, CHUNG SSW, GIACOMELLI S, LEONE MG, XIE Y, SUI Y, MO M, CHENNG CY. Rat prostaglandin D2 synthetase: its tissue distribution, changes during maturation and regulation in the testis and epididymis. *Biol Reprod* 1998; **59**: 843–853.
- [71] SPOLARICS Z. Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 534–541.
- [72] STEINHAUSER ML, KUNKEL SL, HOGABOAM CM, EVANOFF H, STRIETER RM, LUKACS NW. Macrophage/fibroblast coculture induces macrophage inflammatory protein-1 α production mediated by intercellular adhesion molecule-1 and oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 1998; **64**: 636–641.
- [73] SUN X. R, RISBRIDGER GP. Site of macrophage inhibition of luteinizing hormone-stimulated testosterone production by purified Leydig cells. *Biol Reprod* 1994; **50**: 363–367.

- [74] SYED V, GERARD N, KAIPIA A, BARDIN CW, PARVINEN M, JEGOU B. Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6 like factor in the rat seminiferous tubule. *Endocrinology* 1993; **132**: 293–299.
- [75] TAKAO T, MITCHELL WM, TRACEY DE, DE SOUZA EB. Identification of interleukin-1 receptors in mouse testis. *Endocrinology* 1990; **127**: 251–258.
- [76] VALLEDOR AF, BORRAS FE, CULLELL-YOUNG M, CELADA A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 405–417.
- [77] WANG J, WREFORD NG, LAN HY, ATKINS R, HEDGER MP. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulphonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol Reprod* 1994; **51**: 551–561.
- [78] XIONG Y, HALES DB. The role of tumor necrosis factor- α in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993; **132**: 2438–2444.
- [79] YEE JB, HUTSON JC. Testicular macrophages: Isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biol Reprod* 1983; **29**: 1319–1326.
- [80] YULE TD, MAHI-BROWN CA, TUNG KSK. Role of testicular autoantigens and influence of lymphokines in testicular autoimmune disease. *J Reprod Immunol* 1990; **18**: 89–103.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 21.04.2000 r.

Przyjęto: 27.06.2000 r.

31-121 Kraków, ul. Czysa 18

APOPTOZA I METODY JEJ IDENTYFIKACJI*

APOPTOSIS AND METHODS OF IDENTIFICATION OF THIS PHENOMENON

Dorota SULEJCZAK

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

Streszczenie: W piśmiennictwie ostatnich lat wyróżnia się dwa rodzaje śmierci komórkowej. Są to: przypadkowa śmierć komórki, która jest definiowana jako martwica i programowana śmierć komórki, nazwana apoptozą. W niektórych sytuacjach, np. w wielu stanach patologicznych, oba typy śmierci komórkowej mogą współwystępować. Bardzo ważne jest określenie, który rodzaj śmierci komórkowej dominuje w konkretnej chorobie, ponieważ jest to jedna z dróg do znalezienia i zastosowania właściwego leczenia. Do identyfikacji komórek apoptotycznych i martwiczych w badanej populacji komórkowej stosuje się szereg metod. Pozwalają one na wykrywanie endonukleolitycznej degradacji DNA, zmian morfologii komórki i aktywacji lub supresji określonych białek. Niniejsza praca przedstawia i dyskutuje szereg metod, które powinny być użyte do prawidłowej i jednoznacznej charakterystyki śmierci komórki. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 527–568)

Słowa kluczowe: apoptoza, nekroza, fragmentacja DNA, TUNEL, ISNT, histochemia.

Summary: Two alternative modes of cell death are distinguished in the recent literature. The first one is an accidental cell death, generally defined as necrosis and the second one is programmed cell death (PCD), called apoptosis. In some situations, for example in many pathologies, both types of cell death can occur simultaneously. It is very important to know which type of cell death is dominant in case of particular disease, because it determines effective therapy. Numerous methods have been employed to identify apoptotic and necrotic cells. The methods enable to detect endonucleolytic DNA degradation, changes in cell morphology and presence of particular proteins activated. The present study shows and discusses multiple methods that should be used for a proper characterisation of cell death. (*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 527–568)

Key words: apoptosis, necrosis, DNA fragmentation, TUNEL, ISNT, histochemistry.

*Praca dofinansowana z grantów badawczych dla M. Skup 4 P05 A/96/11 oraz D. Sulejczak 6 P04 A/01215

I. WSTĘP

W piśmiennictwie ostatnich lat znaczącą pozycję zajmują artykuły traktujące o różnych typach śmierci komórek. Badania prowadzone w różnych modelach doświadczalnych wykazały, iż proces umierania komórek może przebiegać z odmienną kinetyką i według różnych mechanizmów. Nagłe zahamowanie procesów metabolicznych i rozpad komórki nazwano śmiercią martwiczą. Martwica postrzegana jest jako proces bierny. W trakcie ontogenezy natomiast dochodzi do zaprogramowanej fizjologicznej śmierci określonych komórek organizmu. Jest to proces aktywny. Przebiega z udziałem metabolizmu komórkowego i obejmuje aktywację genów i syntezę białek. Ten rodzaj śmierci nazwano programowaną śmiercią komórek (ang. PCD) lub apoptozą [46,56,71,103]. U osobników dorosłych w przebiegu niektórych stanów chorobowych wykazano w komórkach zmiany podobne pod względem biochemicznym do zmian rejestrowanych podczas apoptozy rozwojowej.

Oba pojęcia śmierci: apoptotycznej i martwiczej odnosi się, szczególnie w opinii klinicystów, do nagłej śmierci komórki. Natomiast schorzenia przewlekłe, podczas których degeneracja i umieranie komórek jest procesem często bardzo powolnym (nieraz trwającym latami), nie mogą być postrzegane jako proces martwiczy. Degeneracja ta jest często związana z powolną utratą funkcji komórki, gromadzeniem się w jej wnętrzu złogów uszkodzonych lub nieprawidłowych białek i substancji lipidowych (np. lipofuscyny). Obserwuje się zmiany morfologiczne typowe dla określonych patologii. Ten rodzaj śmierci komórkowej nie będzie jednak przedmiotem niniejszej pracy.

Opracowano szereg metod badawczych dla celów pełnej charakterystyki typu i przebiegu obumierania komórki, a w szczególności śmierci apoptotycznej. Wbrew powszechnym przekonaniom, nie wszystkie techniki umożliwiają jednoznaczną identyfikację apoptozy. Uzasadnione więc wydawało się podjęcie próby systematycznego omówienia i krytycznej dyskusji tych technik na podstawie danych literaturowych i własnych doświadczeń zdobytych w Zespole, w którym prowadzimy badania nad degeneracją układu nerwowego.

II. MARTWICA A APOPTOZA – RÓŻNICE W OBRAZIE MORFOLOGICZNYM I PRZEBIEGU ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ

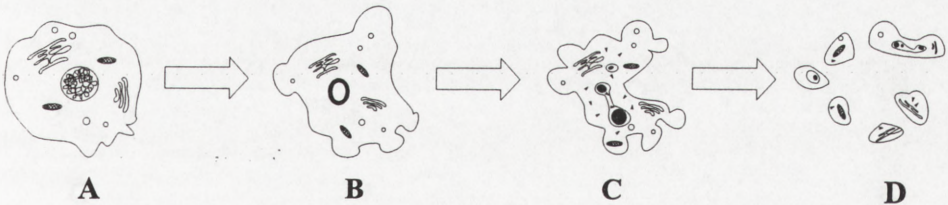
Martwica (*necrosis*, nekroza)

Martwica jest biernym, katabolitycznym procesem degeneracyjnym. Często jest określana jako „przypadkowa” śmierć komórki [56]. Charakteryzuje m.in. wiele

stanów chorobowych. Proces ten jest konsekwencją działania na komórkę czynników uszkadzających jej funkcje w sposób nieodwracalny. Dotyczy często dużych, zwartych grup komórek. Ta powszechność i zsynchronizowanie w czasie znacznie ułatwia wykrywanie komórek martwiczych i pozwala na łatwiejszą rejestrację zjawiska. Martwicę cechuje szereg charakterystycznych zmian morfologicznych (rys. 1, tab. 1), zapoczątkowanych poszerzeniem się siateczki śródplazmatycznej i obrzękiem mitochondriów. Następnie dochodzi do zniesienia aktywnego transportu jonów przez błonę komórkową. W kolejnym etapie procesu błona komórkowa ulega perforacji. Woda i jony, głównie sodu i wapnia, w warunkach fizjologicznych wypompowywane na zewnątrz komórki, wnikają do jej wnętrza. Dochodzi do obrzęku komórki, co jest konsekwencją utraty przez nią zdolności do zachowania równowagi wodno-elektrolitycznej. Zaktywowane endonukleazy tną DNA komórki na fragmenty zróżnicowane pod względem wielkości. Poddane rozdziałowi elektroforetycznemu

TABELA 1. Zmiany rejestrowane w komórce podczas nekrozy

Zmiany morfologiczne	Zmiany biochemiczne	Odpowiedź tkankowa
<ul style="list-style-type: none"> • utrata integralności błony komórkowej • pęcznienie cytoplazmy i mitochondriów • pęcznienie i dezintegracja organelli komórkowych • liza komórki 	<ul style="list-style-type: none"> • zaburzenia funkcji transporterów, kanałów jonowych • cięcie DNA w miejscach przypadkowych • proces pasywny, niezależny od ATP, przebiega również w 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • wywoływana przede wszystkim przez czynniki patogene: wirusy wywołujące lizę komórki, hipotermia, hipoksja, ischemia, trucizny • metaboliczne • dotyka całych grup komórek w tkance • fagocytoza przez makrofagi • odczyn zapalny



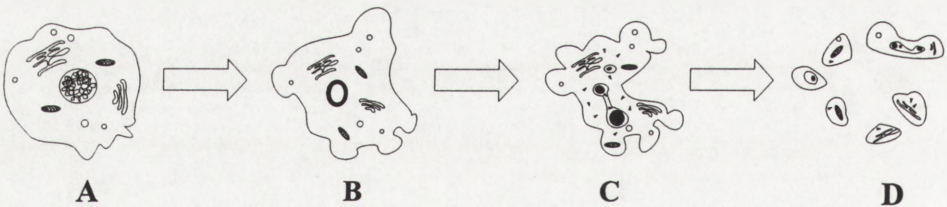
RYSUNEK 1. Schemat zmian morfologicznych obserwowanych w komórce w przebiegu martwicy: A – komórka prawidłowa; B – pierwsze stadium nekrozy; pęcznienie komórki; na tym etapie jest to proces odwracalny; w sytuacji, gdy uszkodzenia komórki wywołujące uruchomienie procesu nekrotycznego zostaną naprawione, komórka może powrócić do stanu prawidłowego; C – nieodwracalne pęcznienie komórki i organelli komórkowych; morfologia jądra komórkowego i chromatyny pozostaje niezmienną na tym etapie trwania procesu; D – dezintegracja komórki i jej organelli, w tym również losowe cięcie DNA; przez uszkodzoną błonę komórkową zawartość komórki wydostaje się do przestrzeni międzykomórkowej wywołując stan zapalny

pofragmentowane DNA formuje w żelu ciągłą smugę (ang. *smear*). Destrukcja chromatyny przebiega w końcowym stadium zmian związanych z procesem martwicy. W ostatnim etapie martwicy dochodzi do rozpuszczenia komórki pod wpływem uwolnionych enzymów lizosomalnych. Tak dzieje się w przypadku martwicy rozplywnej. Może też dojść do obkurczenia się i zestalenia macierzy komórkowej w przebiegu martwicy koagulacyjnej (skrzepowej). Przejawia się ona wzmożoną kwasochłonnością w barwieniu komórki hematoksyliną i eozyną [49].

Martwica jest procesem niespecyficznym i jej obraz zależy od rodzaju uwolnionych enzymów. Powstałe produkty rozpadu komórki wywołują odpowiedź komórek należących do układu odpornościowego, takich jak: leukocyty, limfocyty, makrofagi oraz fagocytozę prowadzącą do usuwania pozostałości martwych komórek i tkanek.

Apoptoza

Apoptoza, w przeciwieństwie do martwicy, jest procesem czynnym, często związanym z aktywacją genów. Określana jest, jak wspomniano, mianem aktywnej śmierci komórki. Charakteryzuje ją szereg specyficznych zmian morfologicznych i biochemicznych (rys. 2, tab. 2). We wczesnym stadium śmierci apoptotycznej dochodzi do kondensacji i fragmentacji chromatyny. Kondensacja rozpoczyna się w strefie obwodowej jądra komórkowego, bezpośrednio przylegającej do błony. Skondensowana chromatyna często przybiera kształt półksiężyca lub koła. Ma wygląd „gładki”, pozbawiony struktury typowej dla normalnego jądra komórkowego. DNA komórki apoptotycznej cięte jest przez endonukleazę zależną od jonów wapnia i magnezu (tzw. CAD – *caspase activated deoxiribonuclease*) [81,102]. Tnie ona nić DNA pomiędzy nukleosomami, tworząc odcinki DNA odpowiadające wielkością nukleosomom (180–200 par zasad (bp)) oraz ich wielokrotności. Rozdzielone metodą

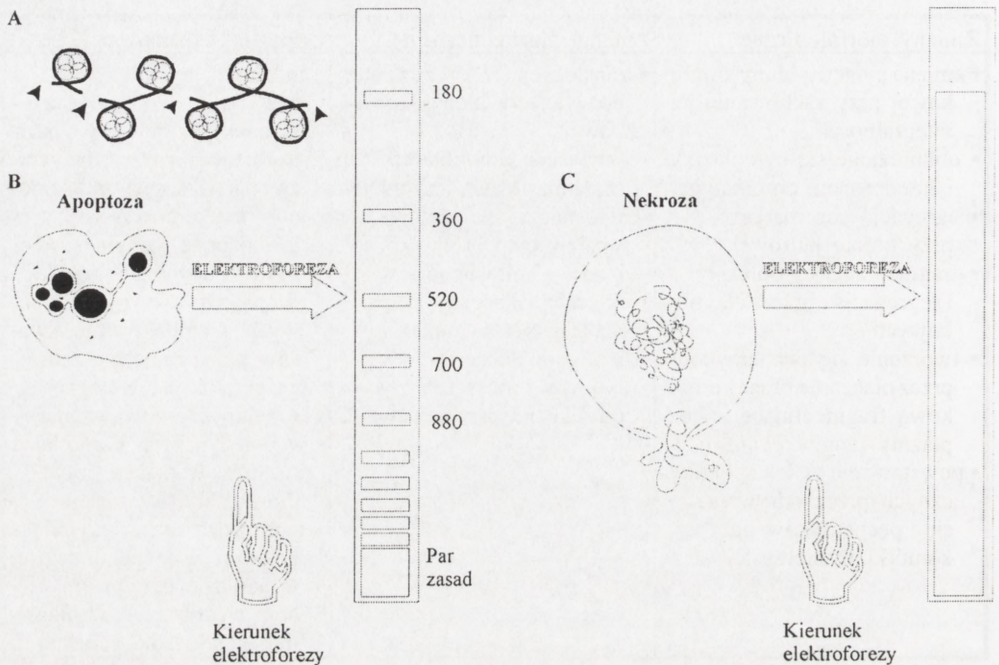


RYSUNEK 2. Schemat zmian morfologicznych rejestrowanych w komórce apoptotycznej: A – komórka prawidłowa; B – komórka apoptotyczna; wczesne zmiany morfologiczne; DNA komórki apoptotycznej ulega kondensacji i łączy się przy błonie jądrowej (czarna obwódka wewnątrz jądra przedstawia pierścień skondensowanej chromatyny); C – skondensowany materiał genetyczny przedstawiono jako ciemne ziarna; DNA jest cięte przez endonukleazy, początkowo na większe fragmenty, a później między nukleosomami; odcinki DNA o niskiej masie cząsteczkowej przemieszczają się do cytoplazmy komórki (czarne strzałki); dochodzi do kurczenia się komórki i jej fragmentacji, błona komórkowa wypukla się i tworzy „pęczeryki” (ang. *blebbing*); D – ciała apoptotyczne powstają w końcowym etapie apoptozy

TABELA 2. Zmiany zachodzące w komórce podczas apoptozy

Zmiany morfologiczne	Zmiany biochemiczne	Odpowiedź tkankowa
<ul style="list-style-type: none"> • zmiana symetrii błony komórkowej przy zachowaniu jej integralności • obkurczanie się cytoplazmy i kondensacja chromatyny • agregacja chromatyny przy błonie jądrowej • fragmentacja cytoplazmy i segregacja organelli komórkowych • tworzenie się pęcherzyków przez otaczanie błoną komórkową fragmentującej cytoplazmy (ang. <i>blebbing</i>) • powstawanie ciałek apoptotycznych przez odrywanie się pęcherzyków od komórki macierzystej 	<ul style="list-style-type: none"> • translokacja FS do zewnętrznej warstwy błony komórkowej • aktywacja kinaz białkowych (np. kinaz MAP, w tym JNK) i fosfataz • wpływ cytochromu c i AIF z mitochondriów • aktywacja kaskady kaspaz • cięcie DNA na mono- i oligonukleosomy • aktywny proces zależny od ATP, nie przebiega w 4⁰C 	<ul style="list-style-type: none"> • indukowana przez: <ol style="list-style-type: none"> 1. zmianę fizjologiczną (spadek poziomu czynników troficznych i wzrostowych, zmiany w dopływie hormonów do komórki) 2. działanie toksyn (zewnętrznych czynników uszkadzających, toksyn komórkowych: nadmiaru aminokwasów pobudzających, tzw. ekscytotoksyn, wolnych rodników, jonów wapnia) • w pojedynczych komórkach rozsiana w tkance prawidłowej • fagocytoza przez rezydujące komórki żerne (np. mikroglej w układzie nerwowym) oraz wędrujące makrofagi • brak odpowiedzi zapalnej

elektroforezy pofragmentowane DNA tworzy w żelu oddzielone od siebie prążki dające charakterystyczny obraz „drabinki”. Jej „szczeble” stanowią odcinki DNA o wielkości nukleosomów i ich wielokrotności (rys. 3). W następstwie tak przebiegającej degradacji DNA można łatwo ekstrahować frakcję DNA o niskiej masie cząsteczkowej (patrz rozdział V) [29]. Należy zaznaczyć, że niektóre typy apoptozy, np. apoptoza rozwojowa, mogą przebiegać bez fragmentacji DNA lub też materiał genetyczny może być cięty na fragmenty o długości 50000–300000 bp (50–300 kb) [67,75,76,83]. Następnie jądro komórkowe ulega fragmentacji. We wczesnym etapie śmierci apoptotycznej, poprzedzającym fragmentację jądra, komórki ulegają odwodnieniu. Ubytek wewnątrzkomórkowych elektrolitów prowadzi nie tylko do kondensacji chromatyny, ale też cytoplazmy, zmniejszenia się i zmiany kształtu komórki. Zbiorniki ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego (w przeciwieństwie do innych organelli komórkowych, które nie wykazują znaczących zmian morfologicznych) w różnym stopniu ulegają poszerzeniu i rozpadowi. Zachodzące w komórce zmiany biochemiczne opisano w rozdziale IV. Do zmian tych należą m.in.: mobilizacja wewnątrzkomórkowego wapnia, destrukcja mikrotubul i aktywacja transglutaminaz, które katalizują powstawanie wiązań między niektórymi białkami komórkowymi [49,72]. W wyniku translokacji fosfatydyloseryny (FS) do



RYSUNEK 3. Schemat elektroforetycznego rozdzielania DNA pozyskanego z komórek apoptycznych i nekrotycznych: A – DNA komórek apoptycznych jest cięte przez specyficzną nukleazę CAD między nukleosomami; miejsca cięcia DNA oznaczono grotami strzałek; w celu uzyskania większej przejrzystości schematu dokonano pewnych uproszczeń: cząstki rdzeniowe nukleosomów, które w rzeczywistości składają się z 8 cząsteczek białek histonowych owiniętych dwukrotnie nicią DNA, przedstawiono jako jednokrotny splot DNA wokół 4 cząsteczek białek histonowych; pominęto również pojedyncze cząsteczki białek histonowych związane z DNA łączącym sąsiadujące cząstki rdzeniowe; B – w trakcie rozdzielenia w żelu elektroforetycznym powstałe odcinki DNA formują prążki tworzące charakterystyczny obraz drabinki; na rysunku przedstawiającym schematycznie komórkę apoptotyczną pokazano dwie frakcje DNA: czarne kółka obrazują frakcję znajdującego się wewnątrz jądra komórkowego skondensowanego (HMW DNA), natomiast małe, czarne znaczniki symbolizują LMW DNA, którego część przez pory w błonie jądrowej przemieszcza się do cytoplazmy komórki apoptotycznej; C – dostępny na całej długości dla enzymów nukleolitycznych materiał genetyczny komórek nekrotycznych (lewa część rysunku) ulega całkowitej destrukcji, a powstałe fragmenty DNA tworzą ciągłą smugę w żelu elektroforetycznym

zewnątrznego listka błony komórkowej rejestruje się zanik asymetrii rozmieszczenia fosfolipidów w błonie [26]. W kolejnym etapie dochodzi do fragmentacji cytoplazmy. Od błony komórkowej odpączkują tzw. ciała apoptotyczne. Są to otoczone błoną fragmenty komórki zawierające resztki cytoplazmy, organelle komórkowe oraz fragmenty chromatyny. Sugeruje się, iż w przebiegu procesu oddzielania się ciałek apoptotycznych od komórki macierzystej dochodzi do wzrostu sumarycznej

powierzchni błony komórkowej. Miałyby być ona uzupełniana w wyniku fuzji pęcherzyków siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego [49].

W materiale tkankowym badanym *ex vivo* apoptozę trudno jest ocenić ilościowo. Jest to konsekwencją intensywności i dynamiki procesu. Apoptotyczna śmierć komórki przebiega w czasie od kilku do kilkunastu godzin, a ciała apoptotyczne ulegają szybkiej fagocytozie [18,46,56,103]. Dlatego liczba rejestrowanych komórek apoptotycznych często stanowi niewielki procent całkowitej liczby komórek, które weszły w stan apoptozy.

Rozróżnienie mechanizmów śmierci komórkowej może sprawiać dużą trudność. Wynika ona z faktu, iż umierająca komórka nie zawsze wykazuje typowy obraz zmian apoptotycznych lub martwiczych [15,27,69]. Podczas apoptozy może np. nie dochodzić do cięcia DNA między nukleosomami lub też, mimo typowej degradacji DNA, mogą nie ujawniać się inne charakterystyczne zmiany. Takie aberracje w obrazie apoptozy spotykane są często w komórkach nabłonkowych [18]. Również niektóre komórki martwicze mogą wykazywać typowe dla apoptozy cięcie DNA [16,27].

III. DLACZEGO APOPTOZA?

Śmierć komórek o mechanizmie i przebiegu podobnym do apoptozy wykryto już u niektórych jednokomórkowych eukariontów, np. u pierwotniaka – orzęska *Tetrahymena thermophila* [3]. Apoptozopodobna śmierć części komórek w przypadku tych organizmów mogłaby służyć kontroli liczebności kolonii w sytuacji ograniczonych zasobów pokarmowych. Występujące u jednokomórkowców prymitywne formy programowanej śmierci komórki mogły być punktem wyjścia do ewolucji apoptozy u wyższych wielokomórkowych organizmów zwierzęcych i roślinnych. Proces programowanej śmierci komórek odkrywa się obecnie w coraz większej liczbie organizmów wielokomórkowych. Wśród bezkręgowców apoptozę stwierdzono m.in. u jamochłona – stułbi. Dochodzi do niej również podczas przepczwarzania się owadów. U kręgowców apoptozę rejestruje się w toku morfogenezy [42], w dojrzewaniu systemu immunologicznego, „obrocie” i odnawianiu się tkanek.

Apoptoza spełnia szczególną rolę w kształtowaniu się układu nerwowego ssaków [9,68]. Rozwijający się zarodek wytwarza nadmiar komórek nerwowych. W okresie przedurodzeniowym i w pierwszych tygodniach po urodzeniu dochodzi do tworzenia się połączeń nerwowych z organami i strukturami unerwianymi. W trakcie tego procesu neuroblasty i niedojrzałe neurony, za pośrednictwem rosnących wypustek (aksonów), współzawodniczą o substancje troficzne i czynniki przeżycia wydzielane przez struktury docelowe. Dokonuje się proces selekcji. Te komórki, które nie wytworzyły połączeń, ulegają eliminacji w przebiegu programowanej śmierci. Uwa-

za się, że w toku rozwoju i dojrzewania układu nerwowego ssaków ginie 50%, a niekiedy więcej, neuronów wyjściowej populacji.

Warto podkreślić fakt, że niektóre komórki umierające w wyniku apoptozy nie są usuwane z organizmu, ale pozostają w nim przez pewien czas. Tworzące naskórek keratynocyty powstają w jego głębszej warstwie podstawowej, skąd migrują na powierzchnię, wypychane przez stale powstające nowe komórki. Przemieszczając się przez warstwę rogową naskórka, keratynocyty umierają. Nie ulegają jednak fagocytozie, ale docierają na powierzchnię skóry, gdzie są złuszczone i stale zastępowane nowymi [20,100]. Z podobnym zjawiskiem mamy do czynienia w przypadku tworzenia się kosmków jelitowych. Komórki tworzące kosmek migrują od jego nasady ku szczytowi. Proces ten trwa kilka dni. Po osiągnięciu celu komórki umierają na drodze apoptozy i ulegają złuszczeniu. Kolejnym przykładem są, formujące się już podczas rozwoju zarodkowego, komórki soczewki oka [20].

Początkowo uwaga badaczy koncentrowała się na roli programowanej śmierci komórek w rozwoju zarodkowym. Jednak szybko zainteresowanie przeniosło się na organizmy dorosłe. We wszystkich ich tkankach znajdowano pojedyncze, pełniące samobójstwo komórki. Przykładem masywnej apoptozy jest dokonująca się w grasicy segregacja dojrzewających limfocytów T, które mogą zostać zmuszone do samounicestwienia, jeżeli staną się potencjalnym zagrożeniem dla organizmu. Przed dostaniem się do krwiobiegu wszystkie limfocyty, które nie potrafią rozpoznać obcych antygenów lub atakują tkanki własnego organizmu, giną śmiercią apoptotyczną. Dzieje się tak jedynie w warunkach fizjologicznych. Zaburzenia apoptozy mogą być jednym z czynników prowadzących do niezdolności organizmu do obrony przed patogenami lub do chorób autoimmunologicznych. Samobójstwo pełnią także komórki poważnie i nieodwracalnie uszkodzone (np. w wyniku mutacji w genomie); na skutek oparzeń słonecznych skóry apoptozie ulegają, opisane wcześniej, keratynocyty. Apoptoza w tych warunkach wywołana jest znacznymi uszkodzeniami materiału genetycznego tych komórek i poprzedza ich migrację w kierunku powierzchni skóry.

Dane literaturowe wskazują na możliwość usuwania przez apoptozę komórek zainfekowanych wirusem. Po wnikięciu do komórki gospodarza wirus hamuje syntezę białek komórkowych i „przestawia” jej maszynę genetyczną na syntezę białek swoich własnych cząstek. W wielu typach komórek może to być sygnał do indukcji apoptozy w zakażonej komórce. Ponieważ śmierć gospodarza grozi eliminacją wszystkim bytującym w niej cząstkom wirusa, niektóre wirusy wykształciły zdolność hamowania apoptozy komórek gospodarza. Mogą to osiągnąć produkując inhibitory apoptozy (np. wirus Epsteina-Barra) lub degradując białka proapoptotyczne (np. wirus ospy krowiej oraz wirus brodawczaka) [20]. Organizm gospodarza nie pozostaje jednak bezbronny. W trakcie ewolucji wytworzył strategię pozwalającą na eliminację zainfekowanych komórek wraz ze znajdującymi się w ich wnętrzu wirusami. Cytotoksyczne limfocyty T wiążą się z zakażoną komórką

docelową i wydzielają perforyny, białka dziurawiące błony komórkowe oraz granzy (patrz rozdział IV), które wnikają przez wytworzone pory do zarażonej komórki i aktywują proteazy ICE – co może wywołać apoptozę. Jeżeli do apoptozy jednak nie dochodzi, to przez powstałe pory wnikają jony wapnia, które współdziałając z granzymami mogą wywołać martwicę zainfekowanej komórki [20].

Do samobójczej śmierci może również doprowadzić pozbawienie komórki czynników wzrostu i przeżycia. Z drugiej strony, dochodzące do komórki sygnały, np. hormonalne o tym, że jest już niepotrzebna, indukują apoptozę. Taki sygnał hormonalny reguluje np. aktywność gruczołów mlekowych i czynność endometrium, wyściełającej macicę błony śluzowej [61]. Sprzeczne wskazówki dotyczące podziału komórki mogą również wywołać jej samounicestwienie. Biologiczna funkcja apoptozy polega więc na eliminacji potencjalnie szkodliwych lub zbędnych organizmowi komórek.

Prawie wszystkie komórki organizmu wykazują zdolność do wejścia w proces programowanej śmierci. Różnica polega na łatwości, z jaką dana komórka może zainicjować swoją śmierć. Podatność komórki na uruchomienie programu śmierci i szybkość jego uruchomienia zależy od typu komórki i stopnia jej rozwoju. Komórki trudne do zastąpienia, np. neurony dojrzałego układu nerwowego, wchodzą w apoptozę trudno. W mózgu dorosłych ssaków właściwie nie dochodzi do namnażania się neuronów, nagła ich utrata może mieć dramatyczne skutki dla organizmu. Dlatego też komórki nerwowe w porównaniu z innymi komórkami organizmu są bardziej „oporne” na apoptozę. Natomiast w komórkach, które szybko ulegają wymianie, np. komórkach krwi, zjawisko to wywołać jest dość łatwo.

Przedmiotem badań nad apoptozą stały się przede wszystkim choroby nowotworowe, w których przebiegu często dochodzi do apoptotycznej śmierci komórek guzów. Istnieją również dane wskazujące na możliwość udziału procesu apoptotycznego w niektórych chorobach zwyrodnieniowych. U podstaw zainteresowania badaczy mechanizmem samobójczej śmierci komórki leży, oprócz celów poznawczych, potencjalna możliwość regulowania i kontroli procesu apoptotycznego.

IV. MECHANIZMY SAMOBÓJCZEJ ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ

Komórki produkują szereg białek umożliwiających im samounicestwienie. Białka te zostają uaktywnione w sytuacji, gdy komórka dostanie sygnał do samozagłady. Szczegółowy opis czynników przeprowadzających oraz kontrolujących przebieg samobójczej śmierci komórki nie jest jednak przedmiotem niniejszego opracowania. Omówiono jedynie te czynniki, które wykorzystuje się jako markery apoptozy w technikach wykrywania komórek apoptotycznych.

Białka Ced-3 i Ced-4

Organizmem najczęściej wykorzystywanym w badaniach nad mechanizmami kontrolującymi PCD stał się nicien *Caenorhabditis elegans* [22,33,34,36–38,41,104–106]. Jest to organizm prosty, którego ciało zbudowane jest z 1090 komórek, więc łatwy do badania. Podczas rozwoju osobniczego 131 komórek jego ciała ulega eliminacji na drodze apoptozy, zależnej od proapoptotycznych produktów genów, takich jak np.: *ced-3* i *ced-4* (*cell death*). Ich negatywnym regulatorem jest białko Ced-9 [36]. Wszystkie komórki ciała nicienia wykazują ekspresję genów śmierci, jednak apoptozie ulega tylko 131 komórek, które nie są chronione przez aktywność Ced-9 [104]. Inaktywacja genu *ced-9* prowadzi do śmierci embrionów *Caenorhabditis elegans* na skutek apoptozy wielu komórek, które powinny przeżyć, gdyż w rozwoju robaka przebiegającym prawidłowo nie są indukowane do śmierci. Natomiast mutacje unieczynnijące geny *ced-3* i *ced-4* blokują tylko apoptozę, umożliwiając przeżycie 131 komórkom przeznaczonym do śmierci. Oszczędzone w ten sposób komórki są zdolne do tylko częściowego różnicowania. Również funkcje, jakie pełnią w dojrzałym organizmie robaka, są bardzo ograniczone [21,35].

Białka Bcl-2

Ssaczy protoonkogen *bcl-2* wykryto w chłoniaku limfocytów B (*B Cell Lymphoma*) [37]. Produkuje on antyapoptotyczne białko o wysokiej homologii do Ced-9, kotwiczące w zewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz błonie jądrowej i błonach siateczki śródplazmatycznej. Rola Bcl-2 w transformacji nowotworowej jest nietypowa. Nie stymuluje ono, jak produkty innych onkogenów, podziałów komórkowych, lecz wzmacnia oporność komórek nowotworowych na apoptozę. Wysoki poziom produkcji białka Bcl-2 jest częstą cechą tych komórek. Przykładem komórek prawidłowych o fizjologicznym wysokim poziomie Bcl-2 są melanocyty. Są to komórki skóry wytwarzające melaninę, która chroni inne komórki przed promieniowaniem ultrafioletowym. Dzięki dużej ilości Bcl-2 trudno wchodzi w apoptozę. Ponieważ zdolność melanocytów do samobójczej śmierci jest bardzo ograniczona, jeśli ulegną one transformacji nowotworowej, nie mogąc umrzeć wytwarzają złośliwy, łatwo tworzący przerzuty nowotwór – czerniak [20].

Stwierdzono, że w komórkach z nadekspresją *bcl-2* apoptoza ulega zahamowaniu lub znacznemu ograniczeniu [45,85]. Białka rodziny Bcl-2 pełnią funkcję regulatorów apoptozy przez oddziaływanie na wiele istotnych dla komórki procesów [60,61,79,84,91,97,98]. Należą do nich:

- 1) kontrola komórkowego poziomu jonów (zwłaszcza jonów wapnia, wodoru, potasu i chloru),
- 2) nadzór nad stanem redoks,
- 3) regulacja wpływu z mitochondriów czynników proapoptotycznych, takich jak: cytochrom c i AIF (*apoptosis inducing factor*),

4) aktywacja enzymów pełniących kluczową rolę w apoptozie (kaspaz i DN-az).

Postuluje się również, że antyapoptotyczne działanie Bcl-2 może polegać na ochronie przed spadkiem mitochondrialnego potencjału transbłonowego [11,32,86]. W komórkach ssaków wykryto inne białka o budowie homologicznej do Bcl-2. Tworzą one wspólną rodzinę białek Bcl-2 [79], z których tylko część działa antyapoptotycznie. Są to: białko **Bcl-xL**, regulujące apoptozę w komórkach nerwowych i nieneuronalne białka **Bcl-w**, **Mcl-1**, **Brag**. Inni przedstawiciele tej rodziny (**Bax**, **Bcl-xS**, **Bak**, **Bik** i **Bad**) wykazują działanie proapoptotyczne. Białka Bcl-2 mają zdolność tworzenia homo- i heterodimerów. Stosunek homodimerów białek antyapoptotycznych do proapoptotycznych w danej komórce decyduje o jej śmierci bądź przeżyciu. Natomiast połączenie się w heterodimery białek o przeciwnym charakterze powoduje inhibicję ich biologicznej aktywności [19].

Kaspazy

Podobnie jak Ced-9 wykazuje podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do Bcl-2, tak Ced-3 wykazuje homologię do specyficznej proteazy człowieka, **kaspazy 1**. Enzym ten, przekształcający nieaktywny biologicznie prekursor interleukiny 1 w formę aktywną, uczestniczącą w wywoływaniu stanów zapalnych [77,106], został pierwotnie nazwany **ICE** (*interleukin-1 converting enzyme*). Odkrywane kolejno białka wykazujące podobną budowę i ten sam mechanizm działania nazwano **proteazami ICE** lub **kaspazami**. Proteazy te trawią białka substratowe w miejscach łańcucha białkowego leżących bezpośrednio za resztą asparaginianową, a do katalizy wykorzystują jedną ze swoich reszt cysteinowych [64]. Te dwie właściwości znalazły swoje odzwierciedlenie w nazwie enzymów – kaspazy (*cysteine-dependent aspartate specific protease*). Proteazy ICE są dimerami zbudowanymi z różniących się wielkością podjednostek. Uczestnicząca w katalizie reszta cysteinowa jest zlokalizowana w większej, a kilka aminokwasów tworzących centrum aktywne enzymu – w mniejszej podjednostce. Kaspazy powstają w postaci nieaktywnych prekursorów. Prekursor składa się na ogół z N-końcowej prodomeny o różnej długości i dwóch właściwych podjednostek rozdzielonych domeną o charakterze regulatorowym. Dojrzewanie i aktywacja enzymu polega na uwolnieniu właściwych podjednostek w wyniku proteolitycznego odcięcia domeny regulatorowej i prodomeny. Uważa się, że w aktywacji kaspaz uczestniczą one same lub proteazy o podobnej specyficzności substratowej, ponieważ miejsca cięcia znajdują się za resztami asparaginianowymi [19,64].

Biologiczna rola proteaz ICE w apoptozie polega na cięciu białek komórkowych. Prowadzi to do zniszczenia komórki w wyniku uszkodzenia jej istotnych składników strukturalnych. Jedną ze ssaczych kaspaz, biorących udział w apoptozie, jest **kaspaza 3**. Jest to białko niezbędne dla prawidłowego rozwoju organizmu. Pełni kluczową rolę w rozwoju układu nerwowego. Pozbawione jej genu embriony mysie giną masowo, a ich mózgi wykazują znaczne nagromadzenie neuronów, do którego nie

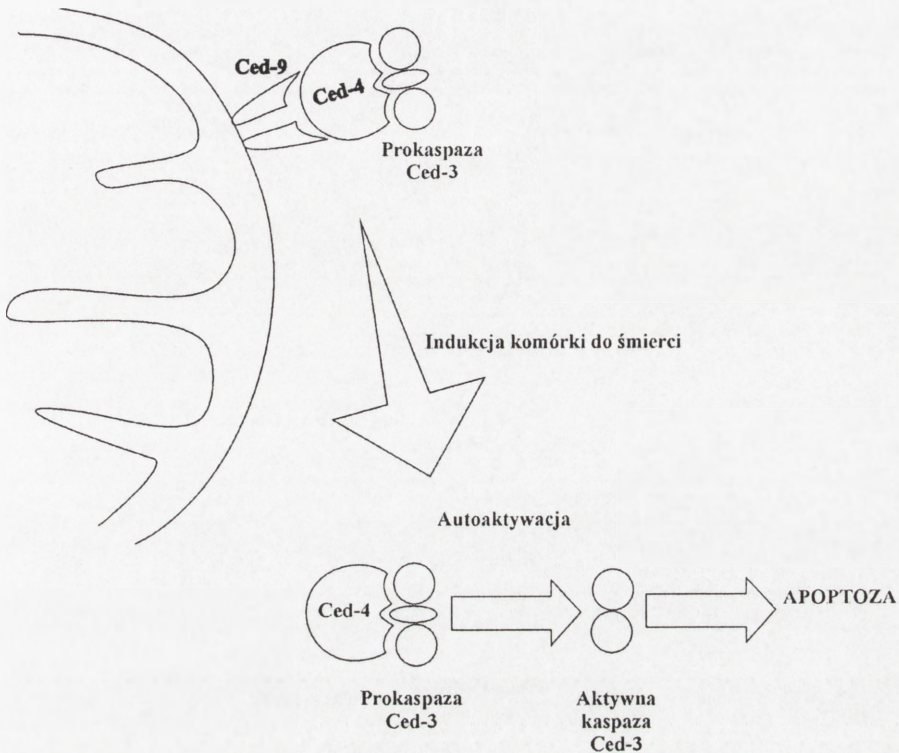
dochodzi w prawidłowym rozwoju osobniczym [19]. Kaspaza 3 wywołuje destrukcję materiału genetycznego przez aktywację endonukleazy CAD [23,55]. Poza tym inaktywuje enzymy naprawiające DNA [51,88], co również uniemożliwia komórce dalsze funkcjonowanie [17,102]. Kluczowe znaczenie kaspazy 3 w apoptozie potwierdza jej zdolność do cięcia białek cytoszkieletowych, takich jak: aktyna i spektryna oraz lamina jądra komórkowego [48,73].

Inna proteaza ICE wykazuje specyficzność substratową wobec antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, które w wyniku katalizy ulegają przekształceniu do białek proapoptotycznych. Zamiast hamować przyspieszają śmierć komórki. Kaspazy uczestniczą także w aktywacji kinaz, odpowiedzialnych za modyfikacje biochemiczne w błonach komórkowych. Powstałe modyfikacje umożliwiają rozpoznanie i wchłonięcie przez komórki sąsiadujące odpączkujących ciałek apoptotycznych. Modyfikacje w błonach komórkowych zachodzą przy udziale aktywowanego przez kaspazy enzymu – **transglutaminazy** [24]. We wczesnych etapach apoptozy katalizuje on powstawanie wiązań lizyna-glutamina w białkach błony komórkowej. Błona cytoplazmatyczna pod wpływem działania transglutaminazy staje się bardziej zwarta. Chroni to komórki, a później ciała apoptotyczne, przed pękaniem i przedostawaniem się ich zawartości do przestrzeni międzykomórkowej.

Podczas apoptozy dochodzi do wzajemnej aktywacji kaspaz. Pojawiło się pytanie o czynnik inicjujący kaskadę kaspaz. Odpowiedź znaleziono znów w badaniach *Caenorhabditis elegans*. Na rysunku 4. wyjaśniono przebieg tego procesu. Kaspaza Ced-4 stymuluje do autokatalizy proteazę Ced-3 w procesie zależnym od ATP [33]. Autoaktywację Ced-3 hamuje białko inhibitorowe Ced-9 związane z błoną mitochondrialną. Ced-9 tworzy kompleksy z Ced-4. Prowadzi to do przemieszczenia Ced-4 z cytozolu do błony mitochondrium, co uniemożliwia mu aktywację zlokalizowanego w cytozolu Ced-3.

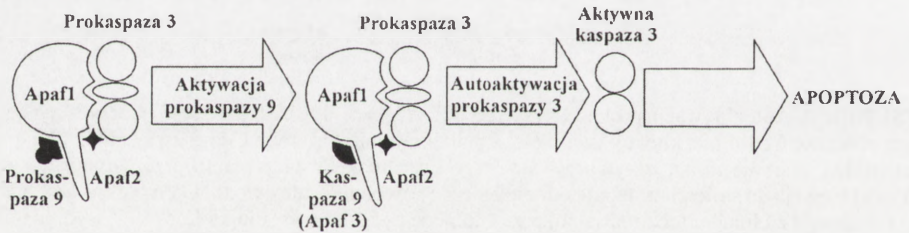
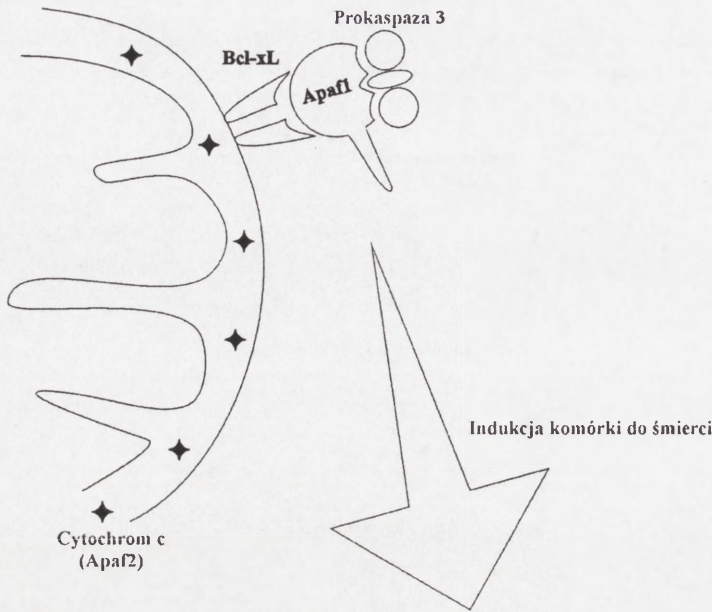
Cytochrom c

U ssaków proces aktywacji pierwszej w łańcuchu przemian kaspazy jest bardziej skomplikowany, choć przebiega podobnie. Odpowiednikiem Ced-4 jest cytozolowe białko **Apaf1** (ang. *apoptosis activating factor 1*), które aktywuje prokaspazę 3 [10,107]. Apaf1 występuje we wszystkich typach komórek, jednak szczególnie wysokie stężenie wykazuje w komórkach narządów i tkanek charakteryzujących się wysokim poziomem apoptozy, np. śledziony, embrionalnego mózgu i płuc [107]. Białko to do swej aktywności wymaga ATP oraz obecności **cytochromu c (Apaf2)**. Cytochrom c jest zlokalizowany w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, gdzie uczestniczy w łańcuchu oddechowym i syntezie ATP. W komórkach będących we wczesnych stadiach apoptozy zarejestrowano wpływ cytochromu c do cytozolu [78]. Uwalnianie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów zachodzi stopniowo i nie zakłóca przemian energetycznych komórki, niezbędnych



RYSUNEK 4. Autoaktywacja prokaspazy Ced-3 u *C. elegans*. Prokaspaza Ced-3 tworzy za pośrednictwem proteazy Ced-4 nieaktywny kompleks z białkiem inhibitorowym Ced-9 związany z błoną mitochondrialną. Hamuje to autoaktywację Ced-3 (górny panel). Po otrzymaniu przez komórkę sygnału stymulującego ją do śmierci następuje oddzielenie się i uwolnienie do cytozolu kompleksu Ced-4/Ced-3 od związanego z błoną mitochondrialną, przez domenę hydrofobową, białka Ced-9. W wyniku oddzielenia od Ced-9 proteaza Ced-4 stymuluje do autokatalizy kaspazę Ced-3 (dolny panel)

do przeprowadzenia apoptozy, która jest procesem ATP-zależnym. Uważa się, że rolę regulatorów wypływu cytochromu c do cytozolu pełnią, opisane wcześniej, białka rodziny Bcl-2. Wynika to z ich potencjalnej zdolności do tworzenia kanałów jonowych w błonach komórkowych [78]. Mechanizm wypływu cytochromu c nie jest do końca poznany i ciągle stanowi przedmiot badań. Proponowane są różne mechanizmy uwalniania tego czynnika. Sugeruje się, że do wypływu Apaf2 dochodzi w wyniku oddziaływań proapoptotycznych białek rodziny Bcl-2 na tzw. megakanały (ang. *megachannels*, zwane inaczej *permeability transition pore* – *PT pore*) [63,97]. Inna hipoteza wskazuje na rolę zmian potencjału elektrochemicznego błony mitochondrialnej w tym procesie. W następstwie tych zmian mogłoby dochodzić do uwolnienia cytochromu c na skutek pęcznienia i pęknięcia zewnętrznej błony mitochondrialnej. Najnowsze dane wskazują, że aktywację prokaspazy 3 poprzedza aktywacja **prokaspazy 9** [33,52]. Ulega ona aktywacji przez kompleks Apaf1/cy-



RYSUNEK 5. Autoaktywacja prokaspazy 3 u ssaków. Białka z rodziny Bcl-2 mają zdolność tworzenia kanałów jonowych w błonach komórkowych. Zlokalizowane w błonie mitochondrialnej (górny panel), regulują wypływ cytochromu c do cytozolu znajdującego się w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej. Po indukcji komórki do śmierci apoptotycznej (dolny panel) uwolniony cytochrom c (Apaf2) tworzy kompleks z cytozolem białkiem Apaf1, które przy udziale ATP aktywuje prokaspazę 9. Aktywna kaspaza 9, jako Apaf3, przyłącza się do kompleksu. Pełny kompleks: Apaf1/Apaf2/Apaf3 stymuluje prokaspazę 3 do autoaktywacji. Aktywna kaspaza 3 prowadzi do destrukcji i śmierci apoptotycznej komórki. Białkami docelowymi dla kaspazy 3 są: A – białka przez nią aktywowane: 1) kinazy białkowe odpowiedzialne m.in. za biochemiczne modyfikacje błon komórkowych, 2) endonukleaza CAD tnąca DNA; B – białka, które kaspaza 3 inaktywuje: 1) enzymy uczestniczące w tzw. splicingu RNA, 2) enzymy naprawiające DNA

tochrom c, a następnie, jako tzw. **Apaf3**, przyłącza się do kompleksu aktywującego kaspazę 3 [10,52] (rys. 5).

Do aktywacji kaspaz może dojść bez udziału Apaf1 i cytochromu c, a więc w drodze niezależnej od Bcl-2. Ma to miejsce np. w procesie eliminacji z organizmu limfocytów B niepotrzebnych po zwalczeniu infekcji. Kluczową rolę w tym procesie

pełnią cytotoksyczne limfocyty T [19]. Pod wpływem ich działania w limfocytach B dochodzi do autoaktywacji **kaspazy 11**. W procesie tym pośredniczy zlokalizowany przy błonie komórkowej kompleks białkowy, związany z pewnymi receptorami powierzchniowymi. Są to m.in.: Fas i receptor TNF (ang. *tumor necrosis factor*) [62]. Także niepotrzebne już organizmowi limfocyty T są usuwane w drodze apoptozy indukowanej za pośrednictwem receptora Fas, przy czym może dochodzić do samoindukcji apoptozy w limfocycie lub też indukcji przez inną komórkę T [20]. Bodźcem aktywującym jest przyłączenie się do receptora jego ligandu wydzielonego przez limfocyty T. Cytotoksyczne limfocyty T mogą zmuszać komórki do apoptozy również dzięki wydzielaniu **granzymu B** [82,96]. Jest to proteaza serynowa wprowadzająca, podobnie jak proteazy ICE, cięcie w łańcuchu białka docelowego za resztą asparaginianową. Ta właściwość granzymu B umożliwia mu aktywację kaspaz bez konieczności ich wcześniejszej samoaktywacji.

Białko AIF

Kolejnym proapoptotycznym czynnikiem uwalnianym z mitochondriów w przebiegu apoptozy jest **AIF** (*apoptosis inducing factor*). Podobnie jak ma to miejsce w przypadku Apaf2, mechanizm uwalniania AIF do cytozolu nie jest do końca wyjaśniony. Jest to kwestia ciągle badana i kontrowersyjna, dlatego też zostanie tu przedstawiona w znacznym uproszczeniu. Proponuje się różne hipotezy. Jedne sugerują, że AIF może opuszczać międzybłonową przestrzeń mitochondrialną na drodze niespecyficzej poprzez uszkodzenia powstałe w zewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek [10]. Inne znów [63] wskazują na związek wypływu tego czynnika do cytoplazmy z megakanalami [50,91,97]. Białko Bcl-2 działa jako endogenny antagonistą kanałów PT i hamuje wypływ AIF do cytozolu [50,91,92], natomiast proapoptotyczne białka rodziny Bcl-2 aktywują ten wypływ [50,91,97]. Uwolniony do cytoplazmy AIF ulega translokacji do jądra komórkowego. Jego proapoptotyczna funkcja polega na aktywacji kaspaz (w tym kaspazy 3), a następnie działaniu, za pośrednictwem aktywowanych jądrowych endonukleaz, na skondensowaną chromatynę jądrową, co prowadzi do jej wstępnej fragmentacji na odcinki wielkości około 50 kb [10,92].

Geny supresorowe nowotworu

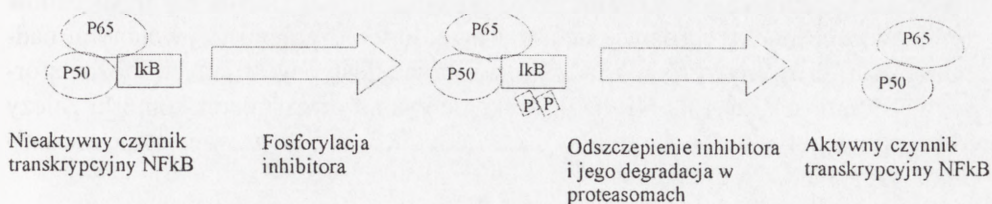
Zarówno programowana śmierć komórki, jak i cykl podziałowy na pewnym etapie mają te same, wspólne mechanizmy regulacji. Uczestniczą w nich geny wczesnej odpowiedzi komórkowej, takie jak: *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, geny niektórych **cyklin** i **kinaz cyklinozależnych** oraz geny supresorowe nowotworu: *p53* (patrz niżej) i *Rb*. Każdy z wymienionych czynników ma inną wartość „identyfikacyjną” jako marker odpowiedzi komórkowej. Jest oczywiste, że pobudzenie genów *c-myc*,

c-fos i *c-jun* może być wskaźnikiem apoptozy. Produkty tych genów uczestniczą jednak w wielu różnych procesach przebiegających w żywej komórce. Nie są swoiste tylko dla programowanej śmierci komórki. Dlatego wykrycie w komórce obecności wspomnianych wyżej białek nie wystarczy, żeby uznać ją za komórkę apoptotyczną. Analiza musi być powiązana z badaniem innych charakterystycznych dla tego typu śmierci markerów.

Wspomniane wyżej białko p53 może indukować apoptozę. Zwłaszcza jeśli wywołana jest ona przez uszkodzenia DNA, które są zbyt rozległe, by komórka mogła je naprawić [89]. Samobójcza śmierć komórki w tym wypadku jest spowodowana aktywacją genu *bax* i zahamowaniem ekspresji genu *bcl-2*, którego p53 jest „wyciszaczem”. Niezdolność do zajścia procesu apoptozy w wielu nowotworach tłumaczy się występowaniem w nich uszkodzeń w genie *p53*. Brak p53 lub występowanie jego niefunkcjonalnych form wykazano w znacznej części nowotworów, m.in. raku jelita grubego, płuc czy piersi.

Czynniki transkrypcyjne

Interesującym białkiem o postulowanym związku z apoptozą jest czynnik transkrypcyjny NFκB. Pełni on rolę regulatora ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe i zapalne [8,87,99]. NFκB jest dimerem białek należących do rodziny REL: p50 i p65 [6–8,65,94]. W większości komórek czynnik ten występuje w formie nieaktywnej związany z białkiem hamującym IκB, maskującym region odpowiedzialny za translokację do jądra komórkowego [58]. W tej formie NFκB jest zgromadzony w cytoplazmie komórki. Aktywacja czynnika (rys. 6) polega na odszczepieniu białka hamującego [8,12,40,94]. Warunkiem zajścia tego procesu jest fosforylacja i następująca po niej degradacja inhibitora IκB [99]. Konieczność degradacji białka inhibitorowego wynika z faktu, że jego ufosforylowana forma również zachowuje zdolność wiązania NFκB [54,57,70]. Aktywny czynnik transkrypcyjny NFκB ulega przemieszczeniu do jądra komórkowego, gdzie łączy się z elementami „κB” w promotorach regulowanych przez siebie genów. Pozbawienie komórek zdolności do syntezy IκB alfa wywołuje konstytutywną stałą aktywację NFκB i prowadzi do szybkiej śmierci zwierząt [95]. Sugeruje to, że NFκB może pełnić rolę induktora w procesach śmierci komórkowej. Zasadnicza większość danych dostępnych na temat NFκB pochodzi z badań komórek układu odpornościowego i komórek nowotworowych. Dopiero wykrycie w ostatnich latach apoptozy w układzie nerwowym skłoniło badaczy do badań tego czynnika w tkance nerwowej [5,43,44]. Z badań innych [43,44] i naszego zespołu [90] wyłania się interesująca możliwość funkcji tego czynnika transkrypcyjnego jako działającej wstecznie cząstki sygnałowej. Szczególnie wysoki poziom czynnika NFκB znaleziono w pewnych populacjach neuronów związanych z aktywnością sekrecyjną hormonów [90]. Pojedyncze prace [13,14,47,53] sugerują proapoptotyczną rolę NFκB w układzie ner-



RYSUNEK 6. Schemat aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB: P – reszty fosforanowe, p50 i p65 – podjednostki czynnika transkrypcyjnego NFκB, IκB – białko inhibitorowe

wowym. Związek tego czynnika z apoptozą wzmacniają również dane wskazujące, że wiele genów indukujących apoptozę należy do potencjalnych genów docelowych dla NFκB. Są to m.in.: *p53*, TNF alfa czy *c-myc*. Za hipotezą proapoptotycznej roli NFκB w układzie nerwowym dodatkowo przemawia fakt, że poziom aktywności NFκB jest negatywnie regulowany przez protoonkogen *bcl-2*. Jesteśmy jednak wciąż jeszcze daleko od jednoznacznego zdefiniowania roli NFκB w apoptozie. Szereg danych wskazuje na rolę NFκB w ochronie neuronów przed śmiercią [4,30,101]. Zahamowanie aktywacji NFκB przez użycie inhibitorów proteasomów, co uniemożliwia degradację IκB, może wywołać fragmentację DNA. Inhibicja NFκB wywołuje również apoptozę w komórkach guza chromochłonnego kory nadnerczy PC12, stosowanego powszechnie modelu komórki nerwowej [93]. Wobec dowodów wskazujących, że wiele genów docelowych dla NFκB to również geny enzymów antyoksydacyjnych, dysmutaz ponadtlenukowych i cytokin [2,13,14,31] sugeruje

TABELA 3. Wybrane czynniki wpływające jednoznacznie na przebieg lub pośredniczące w przekazaniu sygnału do apoptozy (+ aktywacja, – hamowanie)

Nazwa substancji	Wpływ na apoptozę
Bcl-2	–
Bcl-xL	–
Bax	+
Bcl-xS	+
Bad	+
p53	+
C-myc	+
Rb	+
Kaspazy	+
Cytochrom c	+
AIF	+
Granzym B	+
Niedobór neurotrofin	+
Receptory błonowe Fas i p75 po przyłączeniu specyficznych dla siebie ligandów uruchamiają, przekazywany dalej za pośrednictwem wtórnych przekazywników, takich jak: ceramidy, sygnał do apoptozy	+
NFκB	+/- (w zależności od rodzaju komórek i bodźca wywołującego apoptozę)

się, że antyapoptotyczne działanie NFκB wynika ze wzmożenia ekspresji genów produkujących białka chroniące neurony przed uszkodzeniami (wywołanymi nadmiarem Ca^{+2} i wolnych rodników). Na podstawie dostępnych danych można sformułować wniosek, że rola NFκB w funkcjonowaniu oraz śmierci komórki zależy od jej typu i aktywności. Czynniki, takie jak NFκB, nie mogą więc stanowić uniwersalnego markera apoptozy.

V. WYKRYWANIE KOMÓREK APOPTOTYCZNYCH

Jak opisano powyżej, w przebiegu apoptozy dochodzi do aktywacji kaskady procesów molekularnych, prowadzącej do kontrolowanej dezintegracji komórki. Te spośród zmian, które są swoiste dla apoptozy, mogą stanowić wyznacznik tego typu śmierci badanej komórki lub populacji komórek. Dlatego opracowano szereg technik wykrywania apoptozy, pozwalających na analizę badanego materiału doświadczonego pod kątem:

- zmian morfologii komórek,
- przemieszczania się FS wewnątrz błony komórkowej,
- aktywacji kaspaz apoptotycznych,
- wpływu cytochromu c i AIF z mitochondriów,
- degradacji DNA.

Wszystkie te techniki, ze szczególnym uwzględnieniem zalet i wad każdej z nich, zostały szczegółowo opisane w dalszej części niniejszego rozdziału.

Barwienia histologiczne

Podstawowym i najprostszym, a tym samym najpowszechniejszym sposobem identyfikacji komórek apoptotycznych jest badanie zmian morfologii komórek (rys. 2 i tab. 2) i ich poszczególnych organelli przy użyciu mikroskopu świetlnego. I tak, uwidocznienie jąder komórkowych, pozwalające na ocenę ich morfologii oraz stanu kondensacji chromatyny, umożliwia rozróżnienie między martwiczą a apoptotyczną śmiercią badanych komórek oraz odróżnienie komórek umierających od żywych.

W celu uwidocznienia konkretnych struktur komórkowych wykorzystuje się całą gamę barwników, wykazujących powinowactwo do określonych, interesujących nas składników komórki. Używa się zarówno typowych barwników stosowanych w technice mikroskopowania w jasnym polu, jak też barwników, których działanie wynika z ich zdolności do fluorescencji, tzw. fluorochromów. Ze względu na właściwości fizykochemiczne barwniki dzielimy na trzy kategorie:

1. Barwniki kationowe (zasadowe). Używane są one przede wszystkim do barwienia jądra komórkowego i zasadochłonnych substancji cytoplazmatycznych. Najpowszechniejsze zastosowanie w znakowaniu tkanki nerwowej zyskał **fiolet krezyłu** (rys. 7). Umożliwia on uwidocznienie nawet w preparatach o grubości 50 μm kondensacji chromatyny i mocno znakuje ciała apoptotyczne. Barwnik ten znakuje na fioletowo jądro komórkowe neuronu i leżące w cytoplazmie grudki tigroidu, tzw. substancji Nissla, a cytoplazma komórki nerwowej barwi się jasnoniebiesko. **Hematoksylina**, stosowana w barwieniach tkanki nerwowej i innych tkanek, znakuje na niebiesko jądro komórkowe. **Oranż akrydyny** (opisany niżej), oraz **fuksyna zasadowa** są również często stosowanymi barwnikami zasadowymi.
2. Barwniki anionowe (kwaśne), barwiące przede wszystkim cytoplazmę komórki to np. **kwask pikrynowy**, **kwaśna fuksyna**, **zieleń świetlna**, **błękit metylenowy**. **Eozyna**, znakująca na różowo cytoplazmę komórki, bardzo często stosowana jest w kombinacji z hematoksyliną.
3. Barwniki obojętne np.: **fiolet metylowy**, **rodamina B**.

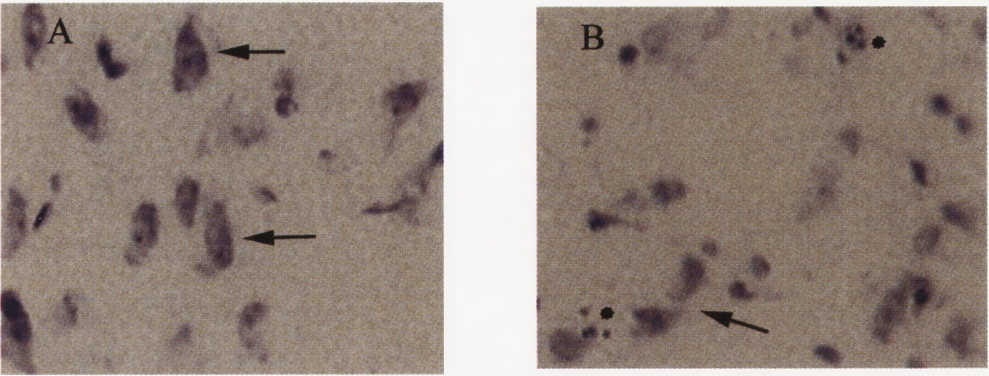
Ze względu na prostotę i dużą szybkość techniki barwienia oraz spektakularne efekty i możliwość stosowania w analizie grubych skrawków tkanki techniką mikroskopii konfokalnej, ogromną popularność zdobyły barwniki fluorescencyjne. Wywołują one tzw. fluorescencję wtórną badanych obiektów. Można je stosować zarówno do preparatów utrwalonych, jak i nieutrwalonych, a nawet żywych. Wynika to z faktu, iż do efektywnego barwienia wystarcza bardzo niskie stężenie barwnika. Wchłonięty barwnik nie zaburza więc funkcji komórkowych lub czyni to w nieznacznym stopniu. Krótka trwająca 5–10 min ekspozycja komórek na fluorochromy umożliwia rozróżnienie komórek umierających od żywych. Barwniki fluorescencyjne znakują komórki martwe, niezależnie od typu ich śmierci. Rozróżnienie między wyznakowanymi komórkami ze wskazaniem czy są to komórki apoptotyczne, czy nekrotyczne wymaga więc dalszych badań.

Pyknotyczna chromatyna komórek apoptotycznych silnie znakuje się barwnikami mającymi zdolność interkalacji do DNA. Do barwienia chromatyny wykorzystuje się barwniki zasadowe (np. fiolet krezyłu), które mając dodatni ładunek odkładają się na naładowanych ujemnie grupach fosforanowych DNA. Najczęściej stosowane barwniki fluorescencyjne używane do znakowania jąder komórkowych to: **jodek propidyny**, **bromek etydyny**, **DAPI**, **fluoresceina (FITC)**, **bis-benzymid (Hoechst)** oraz **oranż akrydyny (AO)**. Oranż akrydyny wykazuje zdolność barwienia w różny sposób jednoniciowego i dwuniciowego DNA (tak zwane: ssDNA i dsDNA, z ang. odpowiednio *single strand* i *double strand*) oraz RNA. AO, który został wbudowany do dsDNA emituje zieloną fluorescencję, natomiast barwnik połączony z ssDNA emituje promieniowanie o czerwonej barwie (rys. 8). Z naszych doświadczeń wynika, że znakowanie oranżem akrydyny umożliwia łatwą ocenę zawartości jednoniciowych kwasów nukleinowych w komórce. Wzbogaca to, w porównaniu z wynikiem barwienia większością fluorochromów (tab. 4) obraz zmian

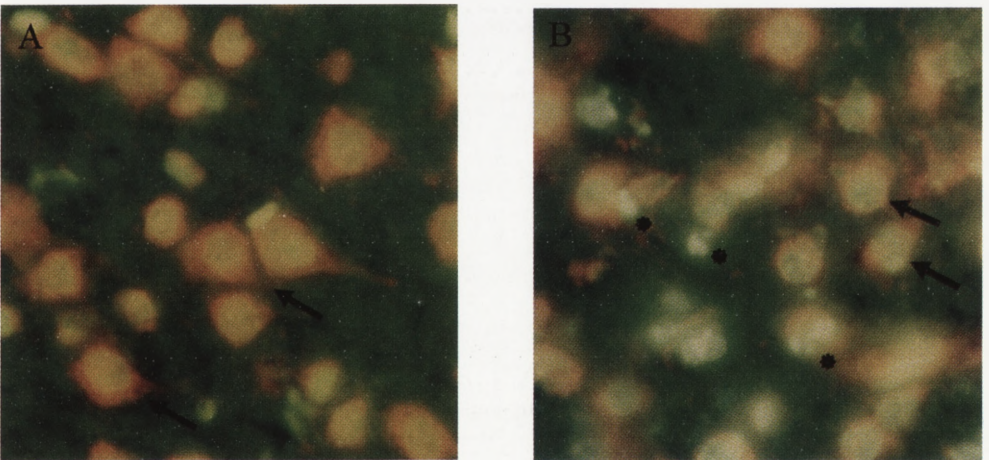
o ocenę stanu kwasów nukleinowych w cytoplazmie komórki. Natomiast Hoechst znakuje tylko jądra komórek (rys. 9). Najpełniejszą informację o stanie fizjologicznym badanej komórki otrzymamy więc stosując kombinację barwień: AO lub bromek etydyny połączone z innym znakującym tylko DNA fluorochromem (np. Hoechst) oraz opisaną niżej technikę TUNEL.

Inne metody umożliwiające odróżnienie komórek martwych od żywych, choć nie pozwalające na rozpoznanie typu śmierci komórkowej, wykorzystują **zmiany zachodzące w błonie komórkowej** komórek umierających. Błona komórkowa żywych komórek, która zachowuje swą strukturę i funkcje, w przeciwieństwie do uszkodzonej błony komórek martwych, jest słabo przepuszczalna dla barwników kationowych, takich jak: **błękit trypanu, jodek propidyny (PI), bromek etydyny i 7-amino aktynomycyna D (7AMD)**. Błona komórek umierających i martwych staje się dla nich całkowicie przepuszczalna. Te różnice w przepuszczalności powodują, że krótka inkubacja w roztworach związków barwników pozwala na niemal selektywne znakowanie komórek martwych. Komórki żywe w tych warunkach wykazują bardzo słaby poziom znakowania. Jest to tzw. test przepuszczalności, do przeprowadzenia którego najczęściej wykorzystuje się błękit trypanu oraz jodek propidyny. Badania prowadzone przy ich użyciu opierają się na podobnych założeniach. Pozwalają na analizę poszczególnych komórek w badanej próbie pod kątem powstawania w ich błonach komórkowych uszkodzeń, wywołujących uprzeczualnienie błon. W związku z tym znakowane są tylko komórki martwe, gdyż żywe nie chłoną barwnika. Technika znakowania jest prosta i szybka. W przypadku wykorzystania **błękitu trypanu**, który znakuje białka wewnątrzkomórkowe, analizę przeprowadza się przy użyciu mikroskopu świetlnego. Barwnik ten znakuje komórki martwicze oraz komórki w późnych stadiach apoptozy. Stanowi to pewne ograniczenie przydatności tej techniki w celu wykrywania komórek apoptotycznych. Użycie do testu przepuszczalności barwiącego DNA **jodku propidyny** pozwala na analizę badanego materiału za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego lub cytometru przepływowego (patrz niżej). Dużą zaletą znakowania badanego materiału przy użyciu tego barwnika jest możliwość przeprowadzenia podwójnego znakowania komórek, z wykorzystaniem drugiego fluorochromu. Można więc jednocześnie badać zmiany zachodzące w błonie komórkowej oraz inne znaczniki apoptozy. Możliwość podwójnego znakowania ma znaczenie, gdyż test przepuszczalności wykrywający uszkodzenia błon komórkowych nie jest specyficzny dla komórek apoptotycznych.

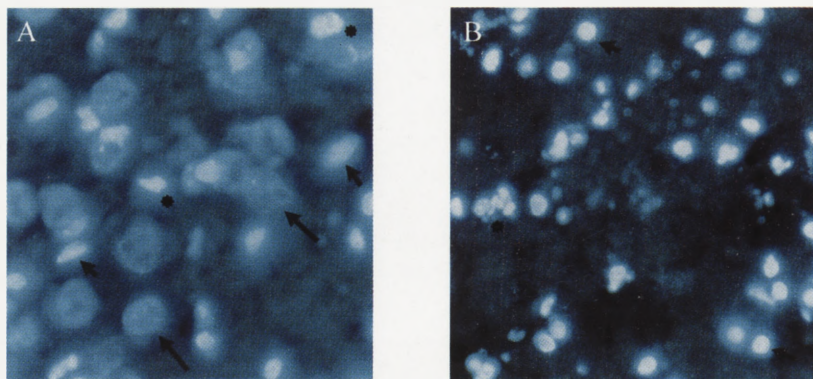
Do wykrycia apoptozy wykorzystuje się także zmiany zachodzące w budowie błony komórkowej. We wczesnym stadium apoptozy cząsteczki fosfolipidu fosfatydyloseryny (FS), które w komórce prawidłowej zlokalizowane są w wewnętrznej warstwie błony komórkowej, ulegają przemieszczeniu do warstwy zewnętrznej [25,26,80]. Komórki apoptotyczne znakuje się wykorzystując aneksynę V, mającą zdolność wiązania się do FS [39] (rys. 10).



RYSUNEK 7. Barwienie przy użyciu fioletu krezyłu komórek mózgu szczura kontrolnego (A) i poddanego odnaczynieniu kory mózgowej (jednostronne częściowe usunięcie naczyń krwionośnych) (B). Uszkodzenie to stanowi model doświadczalny rozległego udaru mózgowego. A – komórki prawidłowe rejonów podkorowych o typowej morfologii neuronów (długie strzałki, pow. 180x). B – w rejonach podkorowych rejestruje się maszyną śmierć neuronów. Ciałka apoptotyczne zaznaczono gwiazdkami. Długa strzałka wskazuje grupę neuronów o budowie prawidłowej (pow. 180x)



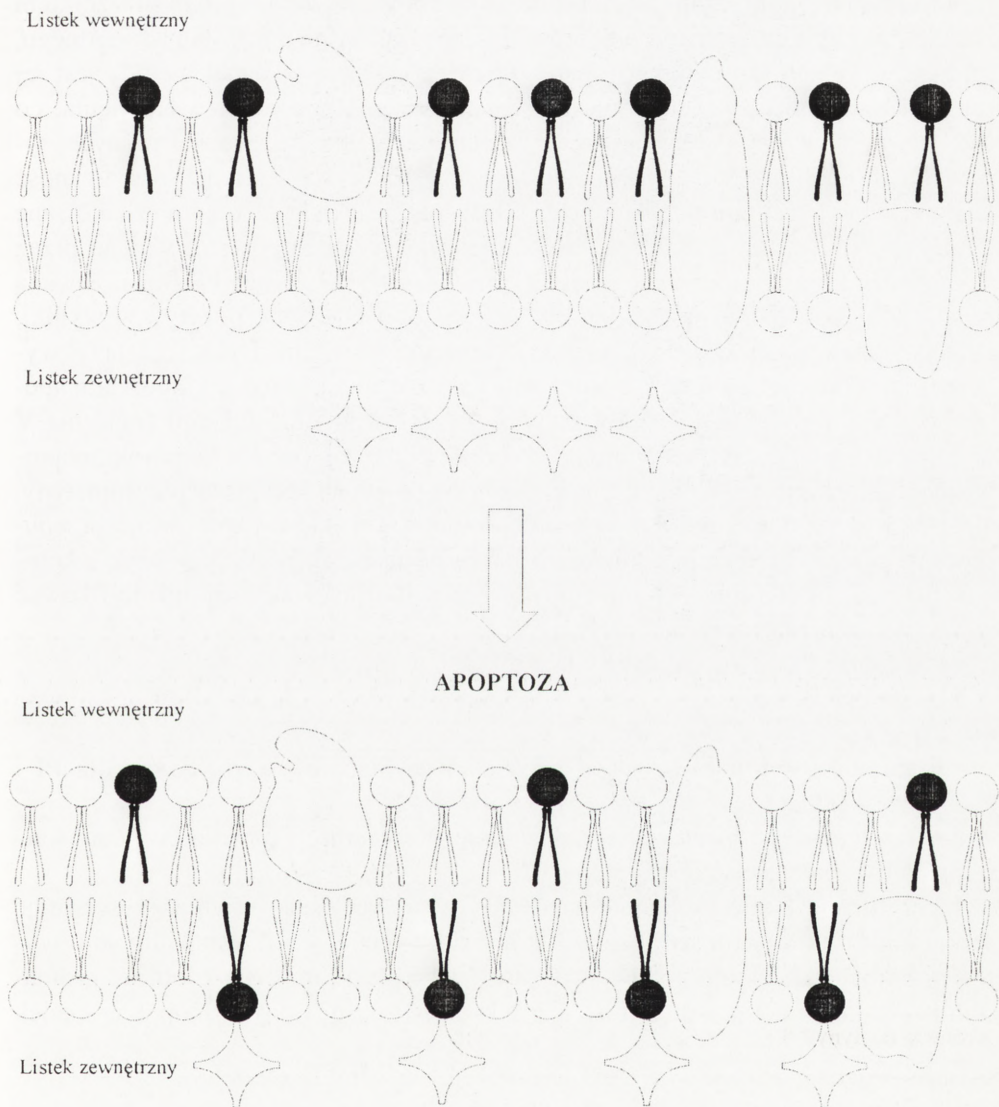
RYSUNEK 8. Znakowanie komórek mózgu szczura oranżem akrydyny. Wyznakowaniu ulegają jądra (kolor żółty) i cytoplazma komórek (kolor czerwony). A – kontrola. Strzałki wskazują komórki prawidłowe wykazujące typową morfologię neuronów (pow. 340x). B – degenerujące w wyniku uszkodzenia, polegającego na usunięciu naczyń krwionośnych z części kory mózgowej, komórki nerwowe obkurczają się. Obserwuje się słabiej wybarwione otoczki cytoplazmatyczne wokół jąder komórkowych i zmiany w jądrach (skondensowana chromatyna w porównaniu z chromatyną komórek prawidłowych wykazuje intensywniejszą fluorescencję (strzałki)). Gwiazdki wskazują ciała apoptotyczne (pow. 340x)



RYSUNEK 9. Znakowanie komórek mózgu szczura odczynnikiem Hoechsta. Wyznakowaniu ulegają tylko jądra komórkowe. A – początkowe stadium degeneracji tkanki. Niezmienione jądra komórek prawidłowych zaznaczono strzałkami. W preparacie widoczne są jądra komórek apoptotycznych z kondensującą chromatyną (krótkie strzałki) i silnie fluoresydujące ciała apoptotyczne (gwiazdki) (pow. 340x). B – późne stadium degeneracji tkanki. W rejonie pozbawionym naczyń rejestruje się dużą masowość apoptozy. Widoczne są komórki w różnym stopniu zaawansowanie procesu. Jądra umierających komórek wykazują silną kondensację chromatyny (krótkie strzałki). Gwiazdki wskazują ciała

TABELA 4. Charakterystyka niektórych fluorochromów, wykazujących zdolność znakowania kwasów nukleinowych

Fluorochrom	Znakowanie/barwienie		Kolor fluorescencji		Barwienie komórek	
	DNA /jądra	RNA/cytoplazmy	jądro	cytoplazma	martwych	żywych
Oranż akrydyny	+	+	zielony	pomarańczowo-czerwony	+	+
Hoechst 33342	+	-	niebieski	-	+	+
Hoechst 33258	+	-	niebieski	-	+	-
DAPI	+	-	j. niebieski	-	+	-
Bromek etydyny	+	+	pomarańczowy	blado czerwony	+	-
Jodek propidyny	+	-	czerwony	-	+	-



RYSUNEK 10. Wykrywanie morfologicznych zmian w budowie błony komórkowej przy pomocy aneksyny. Fosfatydyloseryna (fosfolipid błony komórkowej zaznaczony kolorem czarnym), wchodząca w skład wewnętrznego listka błony komórkowej komórki prawidłowej (górny rysunek), ulega przemieszczeniu do listka zewnętrznego (dolny rysunek) we wczesnych stadiach apoptozy. Fosfatydyloseryna eksponowana na zewnątrz komórki staje się dostępna dla aneksyny (gwiazdki), egzogenego białka wykazującego silne powinowactwo do tego fosfolipidu

Wykrywanie kompleksu FS/aneksyna, w zależności od tego, z jakim znacznikiem została sprzężona aneksyna V, przeprowadza się przy użyciu mikroskopu świetlnego, fluorescencyjnego lub cytometru przepływowego. Zaletą opisanej metody jest jej prostota i szybkość oraz możliwość przeprowadzenia podwójnego barwienia, co pozwala na badanie współwystępowania translokacji FS i obecności różnych, typowych dla apoptozy antygenów komórkowych. Wadą jest niewielka specyficzność techniki wynikająca z tego, iż w pewnych warunkach mogą zostać wyznakowane komórki o prawidłowej budowie błon. Aneksyna V może bowiem wnikać przez pęknięcia błony komórkowej do wnętrza komórki, gdzie łączy się z FS zlokalizowaną w wewnętrznym listku błony komórkowej. Daje to fałszywie pozytywne wyniki. Dlatego konieczne jest stosowanie dodatkowego barwienia DNA, np. przy wykorzystaniu fluorochromów, które pozwala na rozróżnienie między komórkami apoptotycznymi a komórkami nekrotycznymi wyznakowanymi dodatnio aneksyną V w konsekwencji uszkodzeń w błonie komórkowej. Zdolność FS komórek apoptotycznych do reagowania z aneksyną pojawia się po etapie kondensacji chromatyny, ale przed wystąpieniem zmian w błonie komórkowej, które umożliwiają przepuszczenie opisanych wyżej barwników. Barwiąc badane komórki przy użyciu kombinacji znaczników, np. jodku propidyny i aneksyny można więc zidentyfikować w tym samym materiale:

- 1) komórki żywe (negatywne dla aneksyny i PI),
- 2) komórki we wczesnym stadium apoptozy (pozytywne dla aneksyny, negatywne dla PI) oraz
- 3) komórki martwicze i w późnych stadiach apoptozy (pozytywne dla PI i aneksyny) [18].

Jednak technika ta jest użyteczna jedynie w badaniach preparatów jednowarstwowych i komórek nieutrwalonych.

Identyfikację komórek apoptotycznych przeprowadza się również obserwując efekty **zaburzeń czynności organeli komórkowych**. Komórki prawidłowe o wysokim mitochondrialnym potencjale transbłonowym, $\Delta\Psi_m$, mają zdolność gromadzenia w mitochondriach rodaminie 123 (RH123). Rejestrowany w apoptozie spadek

TABELA 5. Znakowanie aneksyną i PI komórek w różnym stanie fizjologicznym

Fizjologiczny stan komórki	Znakowanie	
	aneksyną	PI
Komórki żywe, prawidłowe	–	–
Komórki apoptotyczne – wczesne stadia	+	–
Komórki nekrotyczne i apoptotyczne – późne stadia	+	+

$\Delta\Psi_m$ wiąże się z utratą przez komórkę zdolności do akumulacji tego fluorochromu. Umożliwia to wykrywanie komórek wykazujących zaburzenia funkcji mitochondriów [59].

Badanie aktywności enzymów

Inną techniką badania apoptozy jest monitorowanie aktywacji kaspaz, zwłaszcza kaspazy 3. Metoda ta znalazła zastosowanie w analizowaniu całych populacji komórkowych, a nie pojedynczych komórek. Badanie polega na dodaniu do preparatu enzymatycznie rozpuszczonych komórek substratów kaspazy 3 i pomiarze jej aktywności poprzez określanie zmian ilości produktów reakcji enzymatycznej. Cięcie substratu jest proporcjonalne do stężenia aktywnej kaspazy 3 w badanej próbce. Zaletą tej metody jest jej wysoka specyficzność, nie ma krzyżowej reakcji z innymi kaspazami ICE, gdyż reakcję przeprowadza się z użyciem substratów specyficznych tylko dla badanej kaspazy. Wadą jest wymóg stosowania dużych objętości prób użytych do reakcji, co może mieć znaczenie limitujące w sytuacji dysponowania niewielkimi ilościami materiału badawczego lub niewielką procentowo zawartością komórek apoptotycznych w badanej tkance.

Powszechniejszą techniką pozwalającą na wykrycie obecności aktywnej kaspazy 3 oraz pomiar jej aktywności jest tzw. *Western blot*. Jest to metoda kilkustopniowa. Najpierw przy pomocy elektroforezy rozdziela się na żelu mieszaninę białek homogenatu tkankowego lub jego frakcji. Następnie przeprowadza się tzw. transfer, czyli przeniesienie rozdzielonych składników z żelu na inny nośnik, umożliwiającą uzyskanie trwałego preparatu i jego dalszą obróbkę, np. na nitrocelulozę. Później przeprowadza się reakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciwko kaspazie 3, która prowadzi do wyznakowania tylko tych prążków białek, które reprezentują kaspazę 3. Specyficzność przeciwciała jest tak dobrana, że rozpoznaje ono zarówno prokaspazę 3, jak i aktywną kaspazę 3. W wyniku obróbki proenzymu powstają, reprezentujące aktywną formę enzymu, fragmenty białkowe o mniejszej wielkości. Powstałe fragmenty wykazują szybszą migrację w żelu. Prokaspazę reprezentuje więc jeden wyznakowany prążek, natomiast na powstanie aktywnej kaspazy wskazuje obecność dwóch prążków przesuniętych w stosunku do poprzedniego w kierunku czoła żelu. Dodatkowo przeprowadza się badanie aktywności kaspazy 3 z użyciem specyficznego dla tego enzymu substratu tzw. PARP (polimerazy poli(ADP-rybozy)). Rejestruje się obecność lub jej brak wyznakowanego w reakcji ze specyficznym przeciwciałem prążka dla PARP. Brak prążka wskazuje na degradację substratu dodanego do badanej próby, a więc na obecność w próbce aktywnej kaspazy 3.

Elektroforetyczne wykrywanie fragmentacji DNA

TABELA 6. Obecność i lokalizacja w komórkach frakcji HMW i LMW DNA, w zależności od stanu fizjologicznego komórek

Stan fizjologiczny komórki	Obecność HMW DNA	Lokalizacja HMW DNA		Obecność LMW DNA	Lokalizacja LMW DNA	
		jądro	cytoplazma		jądro	cytoplazma
Prawidłowa	+	+	-	-	-	-
Apoptotyczna	+ stężenie maleje	+	-	+ stężenie wzrasta	+ stężenie wzrasta	+ stężenie wzrasta

Bardzo istotną cechą komórek apoptotycznych jest **cięcie DNA na odcinki nukleosomalne**. Poniżej opisano dwa rodzaje technik badania śmierci komórkowej, które opierają się na wykrywaniu specyficznej dla tego procesu śmierci fragmentacji materiału genetycznego. Pierwsza metoda polega na analizowaniu komórek pod kątem profili zawartego w nich DNA o określonej masie cząsteczkowej. Występujące w jądrach komórek prawidłowych DNA o długości chromosomów lub interfazowa chromatyna określane są jako frakcja DNA o wysokiej masie cząsteczkowej (*high molecular weight*, HMW). Podczas apoptotycznego cięcia materiału genetycznego powstaje tzw. frakcja DNA o niskiej masie cząsteczkowej (*low molecular weight*, LMW), czyli frakcja związanych z histonami mono- i oligonukleosomalnych fragmentów DNA (tab. 6), które przez pory w błonie jądrowej przemieszczają się do cytoplazmy komórek apoptotycznych (rys. 2).

Wykorzystując różnice w masie cząsteczkowej DNA można łatwo oddzielić obie frakcje np. przez wirowanie czy filtrację. Wykrycie LMW DNA w badanym materiale biologicznym jest dowodem na zachodzącą w nim apoptozę. Opracowano szereg metod pozwalających na badanie obecności LMW i HMW DNA zarówno w całych populacjach komórkowych, jak i w pojedynczych konkretnych komórkach tych populacji. W badaniu całych populacji komórkowych, pozyskane z komórek DNA może być znakowane zarówno związkami radioaktywnymi (przy pomocy izotopów radioaktywnych np. ^{32}P), jak i nieradioaktywnymi (np. bromkiem etydydy). Kolejnym krokiem jest rozdział i analiza wyznakowanego kwasu nukleinowego przy pomocy elektroforezy na żelu agarozowym. Należy podkreślić, że w szczególnych postaciach apoptozy, np. apoptozie rozwojowej, nie wykazuje się obecności LMW DNA.

W badaniu poszczególnych komórek populacji, pierwszym krokiem jest zwiększenie przepuszczalności komórek apoptotycznych przy pomocy etanolu lub detergentów. Podczas tej procedury LMW DNA wypływa z komórek i jest usuwane podczas płukań. Pozostałe w komórkach HMW DNA jest znakowane, a jego ilość jest mierzona przy pomocy cytometru przepływowego. Otrzymany w badaniu tzw. szczyt sub G_1 lub A_0 , który przedstawia komórki o najmniejszym stężeniu DNA,

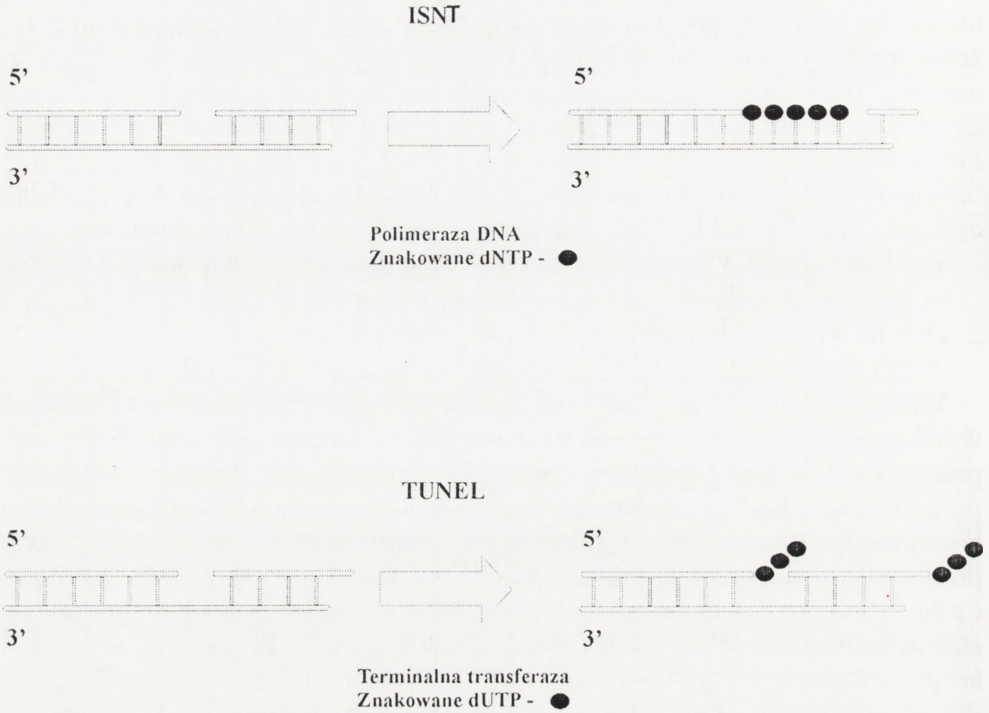
identyfikuje komórki apoptotyczne. Mniejsze niż w komórkach prawidłowych stężenie materiału genetycznego komórek apoptotycznych jest konsekwencją fragmentacji DNA przebiegającej w trakcie śmierci komórki. Metoda pomiarów z użyciem cytometru jest szybka i prosta, niesie jednak ze sobą pewne niedogodności. Przede wszystkim stopień ekstrakcji frakcji LMW DNA podczas płukania i procedury barwienia nie zawsze jest powtarzalny. Nie jest to technika identyfikująca specyficznie tylko apoptozę. Może fałszywie pozytywnie znakować komórki:

- a) z mechanicznie uszkodzoną błoną komórkową,
- b) martwe, pozbawione błony,
- c) o nietypowej strukturze chromatyny i wreszcie
- d) prawidłowe, ale o niskiej zawartości DNA.

Wiedza o różnicach w sposobie degradacji materiału genetycznego zachodzącej w trakcie śmierci komórkowej pozwoliła na różnicowanie między martwicą a apoptozą. Obraz drabinki charakterystyczny dla elektroforetycznego rozdziału DNA pochodzącego z komórek apoptotycznych jest konsekwencją zachowania oktamerów histonowych. Tworzą one rdzeń nukleosomu i chronią nawiniętą na nie nić DNA przed nukleolitycznym działaniem endonukleazy CAD. Dzięki tej ochronie nić DNA trawiona jest poza obrębem nukleosomów [76]. Uzyskanie obrazu drabinki na żelu elektroforetycznym jest podstawowym i decydującym dowodem zajścia typowej apoptozy. Jednak, jak już wspomniano, nie zawsze jest to możliwe. Nie dają takiego obrazu komórki we wczesnych, jeszcze przed fragmentacją DNA, stadiach apoptozy. Czasem limitującą okazuje się ilość badanego materiału. Jeśli apoptoza stwierdzona metodami *in situ* dotyczy niewielkiej subpopulacji komórek badanej tkanki, materiał pozyskany z wybranych struktur danego zwierzęcia może okazać się niewystarczający i zachodzi potrzeba łączenia próbek tkanek z kilku zwierząt doświadczalnych. W przypadku apoptozy nietypowej, występującej bez charakterystycznego cięcia materiału genetycznego, można wykrywać HMW DNA przy pomocy tzw. elektroforezy pulsacyjnej. Pozwala ona na rozdział HMW DNA na wyraźnie rozróżnialne prążki. Dzieje się tak w wyniku zmian kierunku elektroforezy w konsekwencji następujących po sobie zmian kierunku prądu elektrycznego.

Degradacja materiału genetycznego w komórkach nekrotycznych zachodzi wg innego wzorca. W wyniku rozpadu lizosomów, dochodzi do wypływu proteaz. Trawią one m.in. białka histonowe. Jednocześnie dochodzi do aktywacji nukleaz. Pozbawione ochrony oktamerów histonowych DNA jest całkowicie dostępne dla działania enzymów i ulega destrukcji. Na skutek przypadkowych cięć generowane są heterogenne fragmenty DNA, o szerokim spektrum wielkości, które w żelu elektroforetycznym tworzą obraz ciągłej smugi (*smear*) [75].

Wykrywanie *in situ* fragmentacji DNA



RYSUNEK 11. Schemat zasady enzymatycznego znakowania pękniętych nici DNA przy wykorzystaniu metody ISNT i TUNEL. ISNT (górny schemat) wykorzystuje polimerazę DNA, która na matrycy drugiej, nieuszkodzonej nici przyłącza znakowany nukleotyd (czarne kulki) przesuując pęknięcie. Terminalna transferaza stosowana w reakcji TUNEL (dolny panel) nie wymaga matrycy i w miejscu przecięcia DNA dołącza dodane do mieszaniny reakcyjnej, znakowane dUTP (czarne kulki)

Apoptotyczne cięcie DNA przejawia się obecnością dużej ilości pęknięć jedno- i dwuniciowych. Do wykrywania wolnych 3' końców DNA wykorzystuje się enzymatyczne techniki, określane w języku angielskim: *in situ end labeling (ISEL)*. Pozwalają one na wykrywanie pęknięć w materiale genetycznym komórek w preparatach tkankowych lub z hodowli komórkowych, przez enzymatyczne dołączanie do przeciętej nici DNA sprzężonych z biotyną lub digoksygeniną (DIG) nukleotydów. Opracowano metody kilkustopniowej analizy, pozwalające na wzmocnienie wyjściowego sygnału, jakim jest produkt reakcji. Taką metodą rejestracji pęknięć w DNA jest użycie fluorochromu sprzężonego z awidyną, mającą zdolność łączenia się z biotyną, lub z przeciwciałem anti-DIG. Badanie jednostopniowe, przy użyciu którego rejestrowany sygnał jest słabszy, lecz sama reakcja trwa krócej, daje mniejsze tło i jest prostsza technicznie. Wariant ten może polegać na bezpośrednim sprzężeniu z fluorochromem wbudowywanych do DNA deoksynukleotydów. Techniki znakowania pęknięć DNA różnią się między sobą typem wykorzystywanych enzymów,

a tym samym mechanizmem reakcji znakowania wolnych końców materiału genetycznego, który uległ fragmentacji (rys. 11).

ISNT

Technika *in situ nick translation* (ISNT) wykorzystuje DNA polimerazę I lub jej fragment Klenowa, który jest pozbawiony aktywności $3' \rightarrow 5'$ egzonukleolitycznej. Jest to najwcześniej wydzielona i najlepiej zbadana ze wszystkich znanych obecnie polimeraza DNA. Olbrzymie znaczenie, jakie enzym ten zyskał w inżynierii genetycznej, wynika z jego właściwości prawidłowego katalizowania polimeryzacji DNA, co nie wymaga udziału innych białek wspomagających. Fizjologiczną rolą polimerazy I DNA jest udział w replikacji i naprawie DNA. Enzym ten uczestniczy również w rekombinacji i transpozycji. Zgodnie ze swoją funkcją w żywym organizmie, polimeraza I wykazuje znaczną specyficzność wobec substratu. Ma ona zdolność wiązania się do jedno- oraz dwuniciowego DNA, zawierającego luki lub pęknięcia w jednej nici oraz odcinki zdenaturowane. Całkowicie natomiast ignoruje dwuniciowe DNA o nieuszkodzonej strukturze. Polimeraza I wykazuje szereg odrębnych funkcji enzymatycznych. Niezwykle istotna jest jej aktywność **polimeryzacyjna** w kierunku $5' \rightarrow 3'$. Proces polimeryzacji DNA zachodzi w sposób ciągły, bez odłączania się enzymu od matrycy, którą stanowi komplementarna nić DNA. Pierwszym krokiem reakcji jest związanie się enzymu z matrycą DNA i utworzenie kompleksu enzym/matryca/starter. Starter jest krótkim oligonukleotydowym odcinkiem kwasu nukleinowego, do którego podczas replikacji DNA przyłączane są kolejne nukleotydy. Polimeraza reaguje z trójfosforanem nukleotydu (NTP), który dołącza się do enzymu w pobliżu wolnej grupy hydroksylowej (OH) na końcu $3'$ startera. Dołączany do łańcucha DNA nukleotyd tworzy wiązanie wodorowe z komplementarną zasadą matrycy oraz wiązanie fosfodwuestrowe z ostatnim nukleotydem startera. Jednocześnie polimeraza ulega przemieszczeniu wzdłuż matrycy o jedno miejsce do przodu. Nowo dołączony nukleotyd ma wolną grupę $3'\text{OH}$, więc może reagować z kolejnym NTP. W ten sposób następuje elongacja, czyli wydłużanie nici DNA aż do wyczerpania wolnych miejsc na matrycy. Dwie kolejne funkcje polimerazy I są aktywnościami egzonukleolitycznymi. Umożliwiają one degradację DNA w kierunku $3' \rightarrow 5'$ oraz w kierunku przeciwnym $5' \rightarrow 3'$, są więc bardzo ważne w procesie syntezy i utrzymania prawidłowej sekwencji DNA organizmu. I tak, **egzonukleaza $3' \rightarrow 5'$** rozpoznaje i wycina źle sparowany ostatni nukleotyd w rosnącym łańcuchu kwasu nukleinowego. Jest to niezwykle istotne dla zachowania wierności replikacji, gdyż umożliwia ponowne włączenie, w miejsce wyciętego niekomplementarnego nukleotydu, nukleotydu prawidłowego. **Egzonukleaza $5' \rightarrow 3'$** różni się od aktywności **egzonukleolitycznej $3' \rightarrow 5'$** polimerazy I kierunkiem i sposobem działania oraz rodzajem substratu. Wycina ona pojedyncze nukleotydy oraz oligonukleotydy o długości do 10 reszt. Nie rozróżnia deoksy-

rybonukleotydów od rybonukleotydów, co ma olbrzymie znaczenie, ponieważ pozwala polimerazie I na jednoczesne wycinanie starterów RNA oraz wypełnianie powstałej luki w nowopowstającym łańcuchu DNA deoksyrybonukleotydami. Dzięki tej właściwości polimeraza I bierze udział w naprawie DNA. Właśnie tę zdolność enzymu wykorzystuje się w laboratoriach do znakowania nici DNA przez wbudowywanie do niej znakowanych nukleotydów, w procesie tzw. przemieszczania pęknięć (*nick translation*). W technice ISNT polimeraza I przeprowadza reakcję przyłączania znakowanych nukleotydów do wolnego 3' końca DNA. Reakcja zachodzi według opisanego wyżej schematu działania enzymu w komórkach żywego organizmu. Egzonukleolityczna aktywność enzymu w kierunku 5'→3' wycina kolejne nukleotydy, przesuując pęknięcie w DNA, a aktywność polimeryzacyjna 5'→3', wypełnia powstałą lukę znakowanymi nukleotydami. Technika ISNT jest dość skomplikowana i czasochłonna, jednocześnie można wykonać tylko kilka testów. Umożliwia badanie apoptozy na poziomie molekularnym w preparatach tkankowych. Jednak nie jest do końca specyficzna, gdyż znakuje pozytywnie również komórki martwicze i inne charakteryzujące się występowaniem znacznej ilości pęknięć w materiale genetycznym np. intensywnie dzielące się. Ta ostatnia sytuacja jest przeszkodą, gdy analizujemy zachowujące zdolność proliferacji komórki w hodowlach, jednak nie ma znaczenia w badaniach prowadzonych nad tkanką, w której komórki intensywnie dzielące się nie występują lub występują w nieznacznej liczbie. Przykładem może być wspomniana już dojrzała tkanka nerwowa, w której poza hipokampem i opuszką węchową nie dochodzi do podziałów neuronów, a komórkami dzielącymi się są łatwe do identyfikacji komórki gleju.

TUNEL

Kolejną metodą znakowania rozszczepionych końców DNA jest TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick end-labeling*) [28,74]. W metodzie tej wykorzystuje się inny enzym tzw. terminalną transferazę (TdT). Ma ona zdolność dobudowywania, w miejscach pęknięcia nici DNA, znakowanych nukleotydów. Do działania nie wymaga jednak matrycy, a w miejscu pęknięcia dobudowuje znakowany nukleotyd dostarczony w mieszaninie reakcyjnej. Najczęściej jest to znakowany dUTP. TUNEL, podobnie jak ISNT, jest techniką pracochłonną. Jednak góruje nad nią, gdyż jest od niej bardziej specyficzna w znakowaniu komórek apoptotycznych, które w porównaniu z komórkami nekrotycznymi barwi preferencyjnie. Doświadczenia wykazały, że TUNEL umożliwia wykrycie sześciokrotnie większej liczby komórek apoptotycznych od liczby wykrywanej przy pomocy technik barwień histologicznych. Opisane porównanie przeprowadzono na mózdzku mysim [28]. Wynik taki tłumaczy się tym, że TUNEL prawdopodobnie umożliwia wykrywanie komórek we wczesnych stadiach apoptozy, w których zmiany morfologiczne są słabo wykrywalne. Nasze doświadczenia potwierdzają tę sytuację.

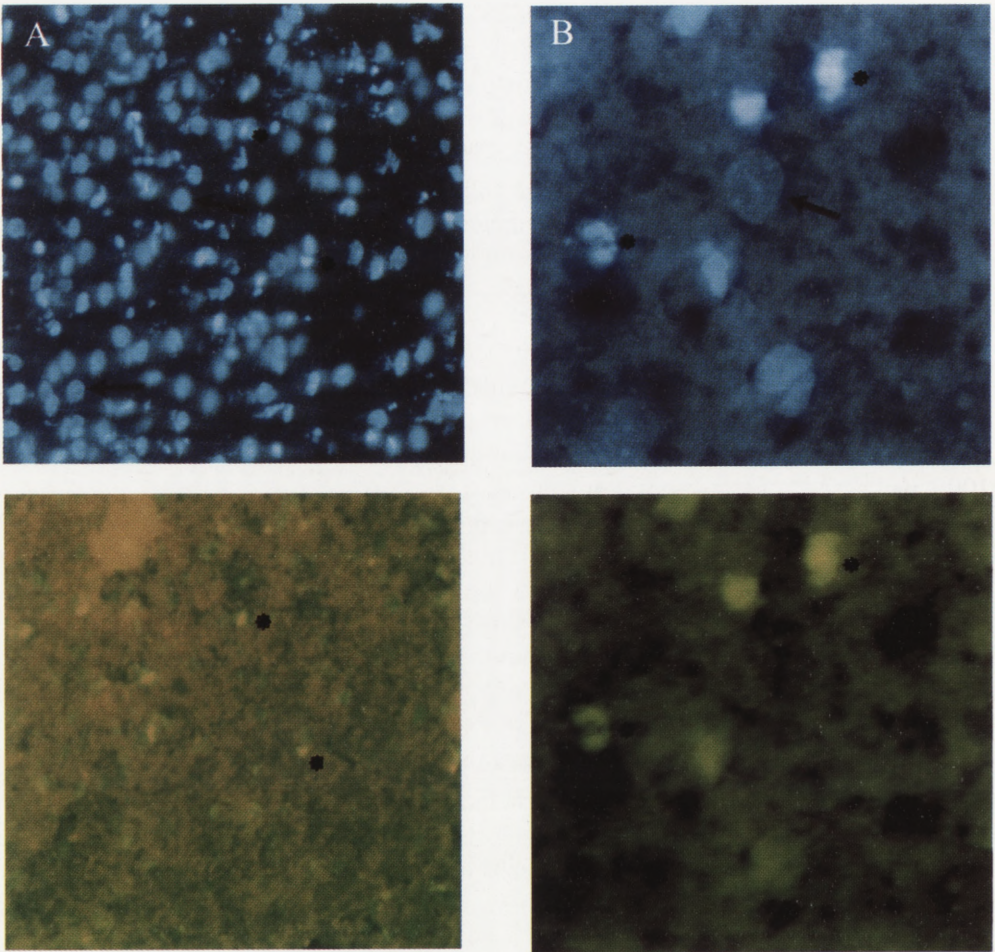
Na rysunku 11 zilustrowano sytuację doświadczalną będącą modelem rozległego udaru mózgowego, w której w uszkodzonym mózgu wykrywa się metodą TUNEL komórki z pęknięciami w DNA. Zastosowanie jednostopniowej analizy skierowanej na wykrywanie znakowanego fluoresceiną dUTP daje mocny specyficzny sygnał i minimalizuje tło w preparatach w materiale tkankowym. Opracowano jednak także techniki kilkustopniowej detekcji, które co prawda powodują powstawanie wyższego tła w tkance, ale pozwalają na znaczną amplifikację sygnału.

Interpretacja wyników pozytywnych w metodzie TUNEL i ISNT

Zasady działania powyższych technik zrodziły wątpliwości, czy obserwowane w badanym materiale znakowanie jest specyficzne dla jąder apoptotycznych, czy też wykrywane są zmiany DNA związane także z martwicą, podczas której DNA również ulega fragmentacji, choć na odcinki znacznie dłuższe, wynoszące około 1000 par zasad. Dodatkowo w materiale pozyskiwanym *post mortem* może być wykrywana pośmiertna degradacja materiału genetycznego. Zebrane doświadczenia wskazują jednoznacznie, że zarówno TUNEL, jak i ISNT nie są technikami wybiórczego znakowania apoptozy. Mogą bowiem znakować miejsca aktywnej replikacji DNA i transkrypcji genów, w trakcie których dochodzi do jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA. Wyłączne stosowanie tych technik może prowadzić, szczególnie gdy analizowany materiał może zawierać również komórki proliferujące, do ryzyka pomyłki: błędnego przypisania zmian mitotycznych apoptozie. Dlatego też wczesne stadia apoptozy, zwłaszcza w hodowli komórkowej, można pomylić z początkowymi etapami mitozy. Sprzyja temu fakt, że hodowane *in vitro* komórki, zarówno dzielące się jak i apoptotyczne, tracą kontakt z podłożem, kurczą się. Zmiany te następują w fazie, w której chromosomy siostrzane komórek dzielących się rozchodzą się do sąsiednich biegunów komórki i pojawiają się, wykrywalne metodami TUNEL i ISNT, pęknięcia w DNA.

Interpretacja wyników negatywnych

Negatywny wynik przeprowadzonej reakcji nie musi świadczyć o braku fragmentacji DNA. Wynik taki może być rezultatem problemów natury metodycznej lub czułości reakcji. Należą do nich: degradacja trójfosfonukleotydów, utrata aktywności enzymu, źle dobrane warunki reakcji. Dlatego niezbędne jest stosowanie w każdym eksperymencie kontroli pozytywnych (np. trawienie próbki nukleazą). Z drugiej strony, stosowanie kontroli negatywnych (np. w próbce pozbawionej enzymu otrzymanie wyniku negatywnego – braku znakowania, co wskazuje na brak pociętego DNA), pozwoli uzyskać pewność, że otrzymany w doświadczeniu wynik wykrytej fragmentacji materiału genetycznego nie powstał na skutek działania związków



RYSUNEK 12. Fragment uszkodzonej w wyniku usunięcia naczyń kory mózgowej szczura znakowanej techniką TUNEL we wczesnej fazie degeneracji. Dobudowywane przez terminalną transferazę w miejscach pęknięć DNA nukleotydy zostały wyznakowane przy pomocy FITC. Żółte zabarwienie tła, w reakcji TUNEL, jest konsekwencją sposobu utrwalania tkanki mózgowej. Ze względu na jednoczesne badanie obecności białka NGF w tkance mieszanina utrwalająca musiała zawierać parabenzochinon, który w warunkach analizy fluorescencji FITC nadaje tkance żółte zabarwienie. A – panel lewy – górne zdjęcie przedstawia barwienie tkanki odczynnikami Hoechst. Pozwala ono na ocenę morfologii jąder komórkowych wyznakowanych przy pomocy reakcji TUNEL (dolne zdjęcie). Komórki z pofragmentowanym DNA (TUNEL-pozytywne) wykazują silną fluorescencję w obu barwieniach (gwiazdki). Jądra prawidłowe (strzałki) są widoczne tylko w barwieniu Hoechstem (pow. 180x). B – panel prawy – w celu uwydatnienia morfologii umierających komórek przedstawiono analogiczny materiał zarejestrowany przy większym powiększeniu. Widoczne w barwieniu Hoechstem jądra komórek prawidłowych (strzałki) nie znajdują się w barwieniu fluoresceiną (TUNEL). Komórki apoptotyczne zaznaczono gwiazdkami (pow. 340x)

zawartych w mieszaninie reakcyjnej, lecz w następstwie zmian zachodzących w komórce w czasie jej umierania.

Badania nad umierającymi komórkami nerwowymi, wykorzystujące technikę TUNEL, wykazały pewną, choć niewielką różnicę w sposobie barwienia komórek nekrotycznych i apoptotycznych. W przypadku komórek umierających na drodze apoptozy, TUNEL znakuje tylko ciała komórkowe. W komórkach martwiczych barwią się zarówno ciała komórek, jak i dendryty. Różnica w sposobie barwienia wynika z faktu możliwości wpływu zdegradowanego DNA do cytoplazmy komórek martwiczych przez ulegającą fragmentacji błonę jądrową (rys. 1D.). Rejestrowane podczas apoptozy przenikanie do cytoplazmy frakcji LMW DNA przez pory w błonie jądrowej daje, w porównaniu z komórkami nekrotycznymi, znacznie mniejszą ilość ulegającego znakowaniu DNA zgrupowanego w cytoplazmie.

Cytometria przepływowa

Kolejną metodą wykorzystywaną do badania apoptozy jest **cytometria przepływowa**, zwana również **cytofotometrią przepływową**. Metoda ta umożliwia pomiar charakterystycznych cech chemicznych i fizycznych komórek lub cząsteczek, które odpowiednio znakowane mijają punkt pomiarowy. Do znakowania komórek używa się fluorochromów. W skład nowoczesnych cytometrów przepływowych wchodzi źródło światła, zbierający układ optyczny oraz układ elektroniczny połączony z komputerem służący do przetwarzania danych. Źródłem światła jest laser emitujący spójne światło o określonej długości fali. Analiza materiału opiera się na pomiarze ilości wzbudzonego światła fluorescencyjnego. Dzięki wbudowanemu układowi soczewek naprzeciwko źródła światła, i drugiemu układowi, umieszczoneму pod kątem prostym względem pierwszego, promień przekazywany jest do dalszych elementów optycznych cytometru. Ulega tam filtrowaniu i rozszczepieniu przed dalszymi pomiarami. Przy odpowiednim zaprogramowaniu komputera, na podstawie ilości mierzonego przez detektor światła, można ocenić takie parametry komórek, jak: rozmiar, kształt, budowa, zawartość wybranych, znakowanych elementów. Cytometr można połączyć z sortownikiem komórek. Będzie on automatycznie rozdzielać komórki wg wcześniej zadanego programu. W ten sposób można:

- otrzymać dane dotyczące komórek o różnej zawartości badanych markerów np. DNA lub RNA,
- zmierzyć zawartość DNA w poszczególnych subpopulacjach komórkowych,
- stwierdzić, jaki odsetek komórek syntetyzuje badane kwasy nukleinowe lub zawiera na swej powierzchni badane antygeny.

Cytometria przepływowa pozwala również na dokładne określenie cech populacji badanych komórek [1]. Wykrywanie komórek apoptotycznych przy użyciu cytometru przepływowego przeprowadza się monitorując charakterystyczne zmiany morfologiczne lub badając zawartość DNA w komórkach. Wtedy to komórki apoptotyczne

TABELA 7. Porównanie wybranych metod wykrywania komórek apoptotycznych

Technika detekcji komórek apoptotycznych	Szybkość przeprowadzenia analizy	Specyficzność wykorzystywanej metody – rozróżnienie między komórkami		Analiza	
		prawidłowymi a apoptotycznymi	nekrotycznymi a apoptotycznymi	całej populacji komórek w badanej próbie lub preparacie	konkretnych komórek z populacji
Obserwacja mikroskopowa zmian morfologii komórek	++(szybka, najdłuższym etapem jest przygotowanie materiału do oglądania pod mikroskopem)	++ (jednoznaczna ocena zmian morfologii komórek)	++ (jednoznaczna ocena zmian morfologii komórek)	+	+
Znakowanie komórek barwnikami (w tym fluorochromami)*	++ (kilka minut)	++(dzięki uwidocznieniu morfologii komórki lub jej organelli, pozwala na jednoznaczną ocenę jej stanu)	++(dzięki uwidocznieniu morfologii komórki lub jej organelli, pozwala na jednoznaczną ocenę jej stanu)	++	++
Test przepuszczalności błony komórkowej	+	+	+/-	-	+
Rejestracja zmian w budowie błony komórkowej (translokacja FS)	++ (kilka godzin)	+/- (nieswoista, wymaga dodatkowych testów)	+/- (nieswoista, wymaga dodatkowych testów)	-	+
Pomiar aktywności kaspazy 3	+	+	+	+	-
ISNT	+/- (kilka godzin)	+/- (znakuje również komórki dzielące się)	+/- (wymaga dodatkowych testów)	+	+

*Znakowanie komórek barwnikami fluorescencyjnymi przewyższa czułością znakowanie barwnikami konwencjonalnymi. Daje również możliwość uzyskania większej ilości danych o kwasach nukleinowych oraz pozwala na jednoczesne znakowanie wielu markerów w badanej komórce. Ze względu na nietrwałość znacznika, tzw. wyświecanie się preparatów, minusem znakowania fluorochromami jest często konieczność krótkiego czasu obserwacji materiału.

cd. tab. 7

Technika detekcji komórek apoptotycznych	Szybkość przeprowadzenia analizy	Specyficzność wykorzystywanej metody – rozróżnienie między komórkami		Analiza	
		prawidłowymi a apoptotycznymi	nekrotycznymi a apoptotycznymi	całej populacji komórek w badanej próbie lub preparacie	konkretnych komórek z populacji
TUNEL	+/(kilka godzin)	+(jw., choć metoda bardziej specyficzna)	+(jw., choć metoda bardziej specyficzna) istnieje możliwość rozróżnienia po wielkości jąder komórkowych)	+	+
Detekcja LMW i HMW frakcji DNA w poszczególnych komórkach	+	+	+/-	-	+
Rozdział elektroforetyczny DNA**	- (kilkanaście godzin)	++(wynik jednoznaczny)	++(wynik jednoznaczny)	+	-

**Mankamentem tej techniki jest konieczność dysponowania dużą próbą materiału w przypadku heterogennej populacji komórek, z której tylko pewna ich część ulega apoptozie. W sytuacji, gdy komórki apoptotyczne stanowią tylko niewielki procent badanej populacji komórek, typowego dla apoptozy rozdziału elektroforetycznego nie można w ogóle wykryć.

identyfikowane są jako komórki z niską zawartością DNA, co wynika z wpływu z tych komórek i utraty, podczas procedur barwienia i płukań, frakcji LMW DNA. Cytometria przepływowa umożliwia szybką, liczoną w minutach, wielopłaszczyznową analizę dużej, nawet kilkumilionowej, populacji izolowanych komórek.

Jak wspomniano, do znakowania komórek w cytometrii stosuje się barwniki fluorescencyjne. W zależności od tego, jakie składniki komórki stanowią cel badania, używa się barwnika mającego zdolność swoistego wiązania się np. z DNA, RNA lub błoną komórkową. Powszechnie stosuje się również znakowanie immunofluorescencyjne. Przy użyciu cytometrii przepływowej możliwe jest także badanie niezabarwionych komórek. Wiązka światła laserowego ulega wtedy rozproszeniu na niezabarwionej komórce, przy czym stożek rozproszenia jest tym większy, im większa

jest średnica komórki. Pozwala to na mierzenie rozkładu i wielkości komórek w danej populacji. Cytometrię przepływową stosuje się również do szybkiego badania populacji zawierających komórki apoptotyczne. Wykorzystuje się fakt, iż zawierają one pocięte na małe fragmenty DNA, frakcje LMW.

Niebezpieczeństwem metody jest ryzyko: a) straty komórek oraz b) w sytuacji gdyby doszło do ich rozpuszczenia, utraty przez wypłukanie, zawartego w nich materiału genetycznego podczas procedury utrwalania i barwienia barwnikami fluorescencyjnymi, zwłaszcza w przebiegu doświadczeń z użyciem komórek nieutrwalonych. Dlatego też preparatykę należy przeprowadzać bardzo ostrożnie, a dla ochrony komórek przed uszkodzeniem używać albuminy i osocza [66].

Na obecność komórek apoptotycznych w badanej próbce wskazuje fakt uzyskania tzw. fazy A_0 lub inaczej szczytu subG1, odzwierciedlającego komórki o najmniejszej zawartości DNA. Cytometrię przepływową uważa się za bardzo dobre narzędzie do wykrywania komórek apoptotycznych. Jest to bardzo szybka i wszechstronna metoda badawcza [18]. Pod warunkiem pełnej swoistości użytych reakcji.

VII. PODSUMOWANIE

Powyżej opisano szereg metod pozwalających na wykrywanie komórek apoptotycznych. Dobór właściwych dla danego eksperymentu technik badawczych zależy w znacznym stopniu od rodzaju materiału biologicznego, który ma być poddany analizie pod kątem występowania w nim apoptozy. Dobór odpowiednich metod badawczych zależy również od tego, czy analizowane są całe populacje komórkowe czy też konkretne komórki tych populacji, czy dysponujemy materiałem utrwalonym, czy nieutrwalonym. Wreszcie, jak duża jest próbka materiału do analizy. W tabeli 7 przedstawiono porównanie najczęściej stosowanych metod wykrywania komórek apoptotycznych z uwzględnieniem oceny wartości i jednoznaczności wyniku uzyskanego przy użyciu danej techniki.

Wymienione w tabeli techniki umożliwiające określenie mechanizmu śmierci danej komórki mają zalety i wady. Większość z nich, prócz znakowania komórek apoptotycznych generuje również pewien procent fałszywie pozytywnych wyników. Dlatego też, w celu przedstawienia dowodów na obecność apoptozy w badanej próbce należy udokumentować zachodzące w niej, charakterystyczne dla procesu programowanej śmierci zmiany przy użyciu szeregu, w miarę możliwości stosowanych jednocześnie na danym materiale metod identyfikacyjnych. Na końcu należy jednak podkreślić, że najistotniejszą techniką dającą całkowitą pewność, że obserwowany proces jest apoptozą, jest jakościowa metoda oceny ultrastruktury komórki.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję paniom doc. Julicie Czarkowskiej-Bauch i dr Małgorzacie Skup za pomoc, cenne uwagi przy redakcji tekstu oraz serdeczność i cierpliwość.

LITERATURA

- [1] Encyklopedia Multimedialna PWN Biologia, (2000).
- [2] ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; **215**: 403–410.
- [3] AMEISEN JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996; **272**: 1278–1279.
- [4] ASURA M, WU M, SONENHEIN GE. TGFbeta inhibits NFkB/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of NFkBalfa. *Immunity* 1996; **5**: 31–40.
- [5] BAKALKIN GY, YAKOVLEVA T, TERENIUS L. NFkB-like factors in murine brain. Developmentally-regulated and tissue-specific expression. *Mol Brain Res* 1993; **20**: 137–146.
- [6] BAUERLE PA, BALTIMORE D. A 65kD subunit of active NFkB is required for inhibition of NFkB by Ikb. *Genes Dev* 1989; **3**: 1689–1698.
- [7] BAUERLE PA, BALTIMORE D. NFkB: ten years after. *Cell* 1996; **87**: 13–20.
- [8] BAUERLE PA, HENKEL T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 141–179.
- [9] BLASCHKE AJ, STANLEY K, CHUN J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 1996; **122**: 1165–1174.
- [10] BUDD SL, NICHOLLS DG. Mitochondria in the life and death of neurons. *Essays Biochem* 1998; **33**: 43–52.
- [11] CASTEDO M, HIRSCH T, SUSIN SA, ZAMZAMI N, MARCHETTI P, MACHO A, KROEMER G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 1996; **157**: 512–521.
- [12] CHEN ZJ, PARENT L, MANIATIS T. Site-specific phosphorylation of Ikbalfa by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 1996; **84**: 853–862.
- [13] CLEMENS JA, STEPHENSON DT, DIXON EP, SMALSTIG EB, MINCY RE, RASH K, LITTLE SP. Global cerebral ischemia activates NFkB prior to evidence of DNA fragmentation. *Mol Brain Res* 1997; **48**: 187–196.
- [14] CLEMENS JA, STEPHENSON DT, SMALSTIG EB, DIXON EP, LITTLE SP. Global ischemia activates NFkB in forebrain neurons of rat. *Stroke* 1997; **28**: 1073–1081.
- [15] COHEN GM, SUN XM, SNOWDEN RT, DINSDALE D, SKILLETER DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 1992; **286**: 331–334.
- [16] COLLINS MK, MARVEL J, MALDE P, LOPEZ-RIVAS A. Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J Exp Med* 1992; **176**: 1043–1051.
- [17] CRYNS V, YUAN J. Proteases to die for [published erratum appears in *Genes Dev* 1999 Feb 1;13(3):371] *Genes Dev* 1998; **12**: 1551–1570.
- [18] DARZYNKIEWICZ Z, JUAN G, Li X., GORCZYCA W, MURAKAMI T, TRAGANOS F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; **27**: 1–20.
- [19] DOMIŃSKI Z. Apoptoza: śmierć komórek w życiu organizmów zwierzęcych. *Kosmos* 1999; **48**: 385–396.

- [20] DUKE RC, OJCIUS DM, YOUNG JD. Śmierć komórki w zdrowiu i chorobie. *Świat Nauki* 1997; **2**: 24–32.
- [21] ELLIS HM, HORVITZ HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986; **44**: 817–829.
- [22] ELLIS RE, YUAN J, HORVITZ HR. Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 1991; **7**: 663–698.
- [23] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**: 43–50.
- [24] FABBI M, MARIMPIETRI D, MARTINI S, BRANCOLONI C, AMORESANO A, SCALONI A, BARGELLESI A, COSULICH E. Tissue transglutaminase is a caspase substrate during apoptosis. Cleavage causes loss of transamidating function and is a biochemical marker of caspase 3 activation. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 992–1001.
- [25] FADOK VA, SAVIL JS, HASLETT C, BRATTON DL, DOHERTY DE, CAMPBELL PA, HENSON PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognise and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992; **149**: 4029–4035.
- [26] FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; **148**: 2207–2216.
- [27] FUKUDA K, KOJIRO M, CHIU JF. Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? *Am J Pathol* 1993; **142**: 935–946.
- [28] GAVRIELLI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; **119**: 493–501.
- [29] GONG YH, GUO X, ZHANG XQ. [Immunoelectron microscopic studies on the process of tumor cytolysis mediated by lymphokine activated NK cells]. *Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih* 1994; **23**: 17–19.
- [30] GOODMAN Y, MATTSON MP. Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid beta-peptide toxicity. *J Neurochem* 1996; **66**: 869–872.
- [31] HALL AV, ANTONIOU H, WANG Y, CHEUNG AH, ARBUS AM, OLSON SL, LU WC, MARSDEN PA. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem* 1994; **269**: 33082–33090.
- [32] HEDLEY DW, McCULLOCH EA. Generation of reactive oxygen intermediates after treatment of blasts of acute myeloblastic leukemia with cytosine arabinoside: role of bcl-2. *Leukemia* 1996; **10**: 1143–1149.
- [33] HENGARTNER MO. Apoptosis. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 1997; **388**: 714–715.
- [34] HENGARTNER MO. Apoptosis: Death by crowd control. *Science* 1998; **281**: 441–444.
- [35] HENGARTNER MO, BRYANT JA. Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds? *Programmed Cell Death in Animal and Plants* edited by: Bryant JA, Hughes SC, Garland JM 2000; 1–12.
- [36] HENGARTNER MO, ELLIS RE, HORVITZ HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; **356**: 494–499.
- [37] HENGARTNER MO, HORVITZ. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994; **76**: 665–676.
- [38] HENGARTNER MO, HORVITZ H.R. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 1994; **4**: 581–586.
- [39] HOLTSBERG FW, STEINER MR, KELLER JN, MARK RJ, MATTSON MP, STEINER SM. Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1998; **70**: 66–76.

- [40] IMBERT V, RUPECRA, LIVOLSI A, PAHL HL, TRAENCKNER BM, MUELLER-DIECKMAN C, FARAHIFAR D, ROSSI B, AUBERGER P. Tyrosine phosphorylation of I κ B α activates NF κ B without proteolytic degradation of I κ B α . *Cell* 1996; **86**: 787–798.
- [41] IRMLER M, HOFMANN K, VAUX D, TSCHOPP J. Direct physical interaction between the *Caenorhabditis elegans* „death proteins”, CED-3 and CED-4. *FEBS Lett* 1997; **406**: 189–190.
- [42] JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC. Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 1997; **88**: 347–354.
- [43] KALTSCHMIDT C, KALTSCHMIDT B, BAUERLE P. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF κ B. *Mechanisms of Development* 1993; **43**: 135–147.
- [44] KALTSCHMIDT C, KALTSCHMIDT B, NEUMANN H, WEKERLE H, BAUERLE P. Constitutive NF κ B activity in neurons. *Mol Cell Biol* 1994; 3981–3992.
- [45] KAMESAKI H, ZWIEBEL JA, REED JC, COSSMAN J. Role of bcl-2 and IL-5 in the regulation of anti-IgM-induced growth arrest and apoptosis in immature B cell lines. A cooperative regulation model for B cell clonal deletion. *J Immunol* 1994; **152**: 3294–3305.
- [46] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging, implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [47] KITAJIAMA I, SOEIJMA Y, TAKASAKI I, BEPPU H, TOKIOKA T, MURAYAMA I. Ceramide induced nuclear translocation of NF κ B is a potential response to TNF α in murine clonal osteoblasts. *Bone* 1996; **19**: 263–270.
- [48] KOTHAKOTA S, AZUMA T, REINHARD C, KLIPPEL A, TANG J, CHU K, MCGARRY TJ, KIRSCHNER MW, KOTHS K, KWIATKOWSKI DJ, WILLIAMS LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; **278**: 294–298.
- [49] LAMPRECHT J, WÓJCIK C. Dynamika powstawania, współdziałania i degradacji struktur komórkowych. *Histologia* red. Ostrowski K. 1995; 111–168.
- [50] LAROCHE N, DECAUDIN D, JACOTOT E, BRENNER C, MARZO I, SUSIN SA, ZAMZAMI N, XIE Z, REED J, KROEMER G. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* 1999; **249**: 413–421.
- [51] LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; **371**: 346–347.
- [52] LI P, NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade *Cell* 1997; **91**: 479–489.
- [53] LIN KI, LEE SH, NARAYANAN R, BARABAN JM, HARDWICK JM, RATAN RR. Thiol agents and bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of NF κ B. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1–14.
- [54] LIN YC, BROWN K, SIEBENLIST U. Activation of NF κ B requires proteolysis of the inhibitor I κ B α alone does not release active NF κ B. *Proc Natl Acad Sci* 1995; **92**: 552–556.
- [55] LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; **89**: 175–184.
- [56] MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; **146**: 3–15.
- [57] MIYAMOTO S, MAKI M, SCHMITT MJ, HATANAKA M, VERMA IM. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of I kappa B alpha is a signal for its degradation but not dissociation from NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 12740–12744.
- [58] MIYAMOTO S, VERMA IM. Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv Cancer Res* 1995; **66**: 255–292.
- [59] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 315–334.

- [60] MOTYL T. Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. *Reprod Nutr Dev* 1999; **39**: 49–59.
- [61] MOTYL T, GAJKOWSKA B, PŁOSZAJT, WARESKI P, ORZECZOWSKA, ZIMOWSKA W, WOJEWÓDZKA U, RYNIIEWICZ Z, REKIEL A. Rola Bax i Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 31–53.
- [62] NAGATA S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; **88**: 355–365.
- [63] NARITA M, SHIMIZU S, ITO T, CHITTENDEN T, LUTZ RJ, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 14681–14686.
- [64] NICHOLSON DW, THORNBERRY NA. Caspases: killer proteases. *Trends Bioch Sci* 1997; **22**: 299–306.
- [65] NOLAN GP, GOSH S, LION HC, TEMPST P, BALTIMORE D. DNA binding and inhibition of the cloned p65 subunit of NFκB, a rel-related polypeptide. *Cell* 1991; **64**: 961–969.
- [66] NUTI S. Multiparametric analysis by flow cytometry. *Apoptosis, a laboratory manual of experimental methods*. 1998; 123–39.
- [67] OBERHAMMER F, WILSON JW, DIVE C, MORRIS ID, HICKMAN JA, WAKELING AE, WALKER PR, SIKORSKA M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J* 1993; **12**: 3679–3684.
- [68] OPPENHEIM RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991; **14**: 453–501.
- [69] ORMEROD MG, O'NEILL CF, ROBERTSON D, HARRAP KR. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp Cell Res* 1994; **211**: 231–237.
- [70] PALOMBELLA VJ, RANDO OJ, GOLDBERG AL, MANIATIS T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NFκB1 precursor protein and the activation of NFκB. *Cell* 1994; **78**: 773–785.
- [71] PETER ME, HRUFELDER AE, HENGARTNER MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 12736–12737.
- [72] PIACENTINI M. Tissue transglutaminase: a candidate effector element of physiological cell death. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; **200**: 163–175.
- [73] PIKE BR, ZHAO X, NEWCOMB JK, POSMANTUR RM, WANG KK, HAYES RL. Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport* 1998; **9**: 2437–2442.
- [74] POLLARD H, CANTAGREL S, CHARIAUT-MARLANGUE C, MOREAU J, BEN-ARI Y. Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *Neuroreport* 1994; **5**: 1053–1055.
- [75] PORTERA-CAILLIAU C, HEDREEN JC, PRICE DL, KOLIATSOS VE. Evidence for Apoptotic Cell Death in Huntington Disease and Excitotoxic Animal Models. *J Neurosci* 1995; **15**: 3775–3787.
- [76] PORTERA-CAILLIAU C, SUNG CH, NATHANS J, ADLER R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 974–978.
- [77] RANO TA, TIMKEY T, PETERSON EP, ROTONDA J, NICHOLSON DW, BECKER JW, CHAPMAN KT, THORNBERRY NA. A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol* 1997; **4**: 149–155.
- [78] REED JC. Cytochrome c: can't live with it – can't live without it. *Cell* 1997; **91**: 559–562.
- [79] REED JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; **17**: 3225–3236.
- [80] RIMONG G, BAZENET CE, PHILPOTT KL, RUBIN LL. Increased surface phosphatidylserine is an early marker of neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 1997; **48**: 563–570.

- [81] SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; **391**: 96–99.
- [82] SHI L, CHEN G, MacDONALD G, BERGERON L, LI H, MIURA M, ROTELLO RJ, MILLER DK, LI P, SESHADRI T, YUAN J, GREENBERG AH. Activation of an interleukin 1 converting enzyme-dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 11002–11007.
- [83] SHIMIZU S, EGUCHI Y, KAMIIKE W, AKAO Y, KOSAKA H, HASEGAWA J, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes. *Am J Physiol* 1996; **271**: G949–958.
- [84] SHIMIZU S, EGUCHI Y, KAMIIKE W, FUNAHASHI Y, MIGNON A, LACRONIQUE V, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 1455–1459.
- [85] SHIMIZU S, EGUCHI Y, KAMIIKE W, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 1996; **12**: 251–257.
- [86] SHIMIZU S, EGUCHI Y, KAMIIKE W, WAGURI S, UCHIYAMA Y, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 1996; **13**: 21–29.
- [87] SIEBENLIST U, FRANZOSO G, BROWN K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; **10**: 405–455.
- [88] SONG Q, LEES-MILLER SP, KUMAR S, ZHANG N, CHANDW, SMITH GCM, JACKSON SP, ALNEMRI ES, LITWACK G, KHANNA KK, LAVIN MF. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 1996; **15**: 3238–3246.
- [89] STRASSER A, HARRIS AW, JACKS T, CORY S. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 1994; **79**: 329–339.
- [90] SULEJCZAK D, SKUP M. Axoplasmic localisation of the NFkB p65 subunit in the rat brain. *Acta Neurobiol Exp* 2000; **60**: 215.
- [91] SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZAMI N, MARZO I, SNOW BE, BROTHERS GM, MANGION J, JACOTOT E, COSTANTINI P, LOEFFLER M, LAROCLETTE N, GOODLETT DR, AEBERSOLD R, SIDEROVSKI DP, PENNINGER JM, KROEMER G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**: 441–446.
- [92] SUSIN SA, ZAMZAMI N, CASTEDO M, HIRSCH T, MARCHETTI P, MACHO A, DAUGAS E, GEUSKENS M, KROEMER G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996; **184**: 1331–1341.
- [93] TAGLIALATELA G, TOLIVER-KINSKY T, PEREZ-POLO JR. NFkB may mediate anti-apoptosis NGF signaling *in vivo*. *Soc Neurosci Abstracts* 1997; **23**: 138–14.
- [94] THANOS D, MANIATIS T. NFkB: a lesson in family values. *Cell* 1995; **80**: 529–532.
- [95] THOMPSON JE, PHILLIPS RJ, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, GHOSH S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 1995; **80**: 573–582.
- [96] THORBERRY NA, RANO TA, PETERSON EP, RASPER DM, TIMKEY T, GARCIA-CALVO M, HOUTZAGER VM, NORDSTROM PA, ROY S, VAILLANCOURT JP, CHAPMAN KT, NICHOLSON DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17907–17911.
- [97] TSUJIMOTO Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 1998; **3**: 697–707.
- [98] TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 2000; **466**: 6–10.

- [99] VERMA IM, STEVENSON JK, SCHWARZ EM, VAN ANTWERP D, MIYAMOTO S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; **9**: 2723–2735.
- [100] VILLEE CA. *Biologia*. 1996.
- [101] WU M, LEE H, BALLAS RE, SCHAUER SL, ASURA M, KATZ D, FITZGERALD MJ, ROTHSTEIN TL, SHERR DH, SONSNSHEIM GE. Inhibition of NFκB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *The EMBO J* 1996; **15**: 4682–4690.
- [102] WYLLIE A. Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature* 1998; **391**: 20–21.
- [103] WYLLIE AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992; **11**: 95–103.
- [104] The *Caenorhabditis elegans* genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 1990; **138**: 33–41.
- [105] YUAN JY, HORVITZ HR. The *Caenorhabditis elegans* cell-death gene ced-4 encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 1992; **116**: 309–320.
- [106] YUAN JY, SHAHAMS S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C. elegans* cell-death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell* 1993; **75**: 641–652.
- [107] ZOU H, HENZEL WJ, LIU X, LUTSCHG A, WANG X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; **90**: 405–413.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 27.04.2000 r.

Przyjęto: 07.07. 2000 r.

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: dorotat@ameba.nencki.gov.pl

CYKL KOMÓRKOWY DWIE KONFERENCJE W 30-LECIE BADAŃ

CELL CYCLE
TWO CONFERENCES FOR 30TH ANNIVERSARY OF STUDIES

Jacek Z. KUBIAK

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

Streszczenie: Artykuł jest sprawozdaniem z dwóch międzynarodowych konferencji naukowych poświęconych kontroli cyklu komórkowego: 237 sympozjum Fundacji Novartis pt. „*The Cell Cycle & Development*”, które odbyło się w Londynie w Wielkiej Brytanii w kwietniu 2000 i konferencji im. Jacquesa Monod pt. „*The Cell Division Cycle, in Honour of Yoshio Masui*”, która miała miejsce w Roscoff we Francji w maju 2000.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 569–581)

Summary: This article renders account of two international scientific conferences on the control of the cell cycle: 237 symposium of the Novartis Foundation. „*The Cell Cycle & Development*” which took place in London, Great Britain in April 2000 and Jacques Monod Conference „*The Cell Division Cycle, in Honour of Yoshio Masui*” which took place in Roscoff, France in May 2000.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 569–581)

WSTĘP

Początek nowoczesnym badaniom nad cyklem komórkowym dało odkrycie czynnika cytoplazmatycznego odpowiedzialnego za rozpoczęcie fazy M cyklu komórkowego. Czynniki ten o nazwie MPF (od ang. *Maturation Promoting Factor* lub *M-phase Promoting Factor*) wykryli w oocytach żaby Masui i Markert w roku 1971 [1]. Wykazali oni, że przeszczepienie niewielkiej ilości cytoplazmy pochodzącej z dojrzałych oocytów (zablokowanych w metafazie drugiego podziału dojrzewania mejotycznego – MII) do oocytów niedojrzałych (zablokowanych w profazie pierwszego podziału mejotycznego odpowiadającemu fazie G2 cyklu komórkowego) indukuje dojrzewanie mejotyczne tych ostatnich. W warunkach fizjologicznych,

proces dojrzewania mejotycznego oocytów indukowany jest hormonalnie. Wywołanie tego procesu w niedojrzałym oocyście przez przeszczepienie cytoplazmy z oocytu dojrzałego bez indukcji hormonalnej wykazało, że cytoplazma ta zawiera czynnik powstający normalnie podczas dojrzewania oocytu na skutek działania hormonów. Dzięki temu odkryciu można było badać wewnątrzkomórkowe mechanizmy indukcji fazy M. Wkrótce okazało się, że ten sam czynnik powoduje rozpoczęcie zarówno mejotycznej, jak i mitotycznej fazy M. Przez wiele lat nie udawało się ustalić biochemicznej natury MPF. Dopiero w 1989 r. doniesienia z kilku laboratoriów badających regulację cyklu komórkowego drożdży, *Xenopus laevis* i rozgwiazdy pozwoliły na identyfikację tego czynnika. Wykazano, że jest nim kompleks dwóch białek. Jednym z nich jest enzym fosforylujący inne białka – a więc kinaza, zidentyfikowany u drożdży dzięki badaniom mutanta o nazwie *cdc2* (ang. *cell division cycle 2*). Stąd wzięła się inna nazwa tego samego enzymu – kinaza Cdc2. Drugi komponent MPF to białko regulatorowe, którego ilość ulega bardzo drastycznym zmianom w trakcie cyklu komórkowego – stąd jego nazwa – cyklina. Okazało się z czasem, że istnieje wiele cyklin. Co najmniej dwie zaangażowane są w kontrolę fazy M – cykliny typu A i B. Gromadzą się one w dużych ilościach przed rozpoczęciem tej fazy cyklu komórkowego i są gwałtownie niszczone w procesie proteolizy w jej trakcie. Również kinaza Cdc2 okazała się jednym z wielu enzymów z rodziny CDK (ang. *Cycline-Dependent Kinases*). Za klasyczny MPF uważa się kompleks cyklina B/Cdc2, chociaż istnieje też w komórce mitotycznej kompleks cyklina A/Cdc2, który pełni rolę wspomagającą aktywację głównego kompleksu. W komórkach różnych organizmów wykryto po kilka genów kodujących cykliny A i B. U *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, myszy i człowieka wykryto cykliny A1, A2 i B1, B2 i B3. W komórkach roślin jest ich jeszcze więcej. Mówimy tu wyłącznie o cyklinach zaangażowanych w regulację fazy M, gdyż w skład rodziny cyklin wchodzi wiele innych białek biorących udział w regulacji pozostałych faz cyklu komórkowego. Każda z cyklin tworzących kompleks z kinazą Cdc2 wydaje się wpływać na różne aspekty aktywności danego kompleksu. Dość szybko stało się jasne, że kontrola cyklu komórkowego wymaga doskonałej regulacji dwóch podstawowych procesów: odwracalnej fosforylacji białek (efekty działania kinazy Cdc2 w postaci fosforylacji białek są równoważone aktywnością fosfataz prowadzących procesy defosforylacji) i syntezy specyficznych białek, nierozzerwalnie związanej z procesem degradacji proteolitycznej (tak dzieje się właśnie z oscylującymi w trakcie cyklu komórkowego cyklinami). Co więcej, różnice w doborze partnera regulatorowego, a więc cykliny, mogą zmieniać specyfikę aktywności enzymu CDK. Wyciągnięcie prawidłowych wniosków z wczesnych badań przyczyniło się do lawinowego postępu badań nad kontrolą cyklu komórkowego. Poza poznaniem samych enzymów CDK i ich cyklin zidentyfikowano również skomplikowaną sieć innych kinaz i fosfataz i opisano mechanizmy regulujące zarówno poziom syntezy, jak i czas i miejsce degradacji proteolitycznej poszczególnych białek kontrolujących

przebieg cyklu komórkowego. Zidentyfikowano również inne sposoby regulacji przebiegu cyklu komórkowego, np. poprzez działanie białkowych inhibitorów enzymów z grupy kinaz CDK.

Okazało się, że subkomórkowa lokalizacja wielu enzymów kontrolujących cykl komórkowy może odgrywać decydującą rolę w wypełnianiu takiej a nie innej funkcji. Przykładem może być centrosom – autonomicznie namnażająca się struktura komórkowa zawierająca centriole. Centrosomy zawierają wiele białek wspólnych dla kontroli jądrowego cyklu komórkowego (np. właśnie MPF, czyli kompleks Cdc2/cyklina B indukujący kondensację chromatyny), jak i kontroli cyklu samych centrosomów (np. kompleks Cdk2/cyklina E, który jest również zaangażowany w kontrolę fazy S). Na prawidłowy przebieg cyklu komórkowego składa się zarówno kontrola cyklu jądrowego (kondensacja i dekondukcja chromatyny), jak i cyklu przemian centrosomów. Namnażanie centrosomów skoordynowane z cyklem jądrowym decyduje o prawidłowej strukturze wrzeciona podziałowego i równomiernym rozdziale chromosomów podczas podziału komórkowego. Dzisiaj zdajemy więc sobie sprawę z tego, że prawidłowy przebieg cyklu komórkowego wymaga ścisłej koordynacji czasowej i przestrzennej wielu funkcji bardzo licznych enzymów. Koordynację tę zapewnia wiele mechanizmów śledzących przebieg cyklu komórkowego i wykrywających nawet drobne usterki w jego funkcjonowaniu. System monitorujący przebieg poszczególnych faz cyklu komórkowego określa się angielskim terminem „checkpoint”, a więc punkt kontrolny. Nadzorowi typu „checkpoint” poddane są dwie główne fazy cyklu komórkowego: S i M. Wystąpienie zaburzeń właśnie w trakcie tych dwóch faz jest bowiem najgroźniejsze dla życia komórki, co tłumaczy wzmożoną kontrolę ich przebiegu. Zaburzenie replikacji DNA w trakcie fazy S, czy segregacji chromosomów w fazie M prowadzi do aneuploidii, a ta jest często powodem np. transformacji nowotworowej. System kontroli typu „checkpoint” pozwala na czasowe wstrzymanie przebiegu cyklu dając komórce czas na naprawienie błędów. Może też skierować komórkę obciążoną błędem-mutacją na drogę apoptozy, czyli śmierci komórkowej. Dla prawidłowego funkcjonowania organizmu bardzo ważne jest wyeliminowanie wadliwych komórek, gdyż utrata kontroli nad ich podziałami zaburza rozwój organizmu i może prowadzić do jego śmierci. Pierwszym krokiem w eliminacji zmutowanych komórek jest właśnie włączenie alarmu poprzez system monitorujący przebieg cyklu komórkowego.

Ten, z ewidentnych przyczyn uproszczony, obraz kontroli cyklu komórkowego pozwoli – mam nadzieję – czytelnikom na łatwiejszą analizę współczesnych badań w tej dziedzinie. Podsumowaniem obecnego stanu wiedzy na temat kontroli przebiegu cyklu komórkowego były dwie międzynarodowe konferencje, które odbyły się w kwietniu i maju 2000. Pierwsza z nich to 237. sympozjum Fundacji Novartis pt. „*The Cell Cycle & Development*”, które odbyło się w Londynie w Wielkiej Brytanii. Druga zaś to konferencja im. Jacquesa Monod pt. „*The Cell Division Cycle, in Honour of Yoshio Masui*”, która miała miejsce w Roscoff we Francji.

Poniższy tekst nie pretenduje do roli przeglądu wiedzy na temat cyklu komórkowego, a jest jedynie sprawozdaniem z najciekawszych moim zdaniem doniesień przedstawionych na tych dwóch konferencjach. Pozwala zorientować się w kierunkach współczesnych badań cyklu komórkowego i poznać zarówno główne pytania, jakie zadają sobie naukowcy, jak i sposoby, jakimi się posługują dla uzyskania odpowiedzi.

ZWIĄZKI MIĘDZY KONTROLĄ CYKLU KOMÓRKOWEGO, RÓŻNICOWANIEM I WZROSTEM KOMÓREK W TRAKCIE ROZWOJU ORGANIZMU

OFundacja Novartis (dawniej Fundacja Ciba) organizuje od roku 1950 konferencje poświęcone najważniejszym współczesnym problemom naukowym. Celem tych konferencji jest zapewnienie jak najlepszych warunków do swobodnej dyskusji w wąskim gronie specjalistów z danej dziedziny. Na temat 237. sympozjum wybrano rolę cyklu komórkowego w rozwoju zwierząt i roślin. Konferencja, która odbyła się w dniach 10–13 kwietnia 2000 w siedzibie Fundacji Novartis przy Portland Place w Londynie, zgromadziła 27 uczestników (14 mówców i 13 dyskutantów), jak również przysłuchujących się dyskusji dziennikarzy pism naukowych *Cell*, *Nature*, *Bioessays* i *Genome Biology*. Przewodniczącym obrad był Paul Nurse z *Imperial Cancer Research Fund* w Londynie. Celem naszej dyskusji było zdefiniowanie roli różnych aspektów kontroli cyklu komórkowego w procesie rozwoju organizmów (od drożdży, poprzez nicienie, owady, ssaki, do roślin wyższych). Podjęliśmy także próbę określenia zależności pomiędzy programami namnażania się komórek, czyli proliferacją, różnicowaniem, a także regulacją wzrostu zarówno samych komórek, jak i całych organów i organizmów. Wydanie książkowe doniesień z tej konferencji ukaze się w serii wydawnictw Fundacji Novartis [2].

Pierwszym mówcą był Bruce Edgar z *Fred Hutchinson Cancer Research Center* w Seattle w USA. Bruce porównał ze sobą 3 typy cyklu komórkowego obserwowanego w trakcie rozwoju *Drosophila melanogaster*. Do pierwszego z nich należą szybkie podziały zarodka następujące bezpośrednio po zapłodnieniu oocytu. Główną rolę kontrolną w tych cyklach odgrywa mechanizm decydujący o czasie i miejscu rozpoczęcia mitozy. Punktem kontrolnym w tym typie cyklu komórkowego jest więc przejście z fazy G2 do M (czyli decyzja rozpoczęcia mitozy). Regulacji podlega więc aktywacja MPF (Cdc2/cyklina B). Proces ten zależy od zgromadzonego w oocycie w trakcie oogenezy (zarówno w postaci mRNA, jak i białka) matczynego produktu genu *cdc25* kodującego fosfatazę Cdc25. W tym wczesnym okresie rozwoju, komórki wykazują bardzo nikły wzrost. Wzór podziałów komórkowych w rozwijającej się larwie odpowiada dokładnie wzorowi ekspresji zarodkowego mRNA kodującego Cdc25. Przestrzenna regulacja ekspresji genu *cdc25* w larwie odbywa

się dzięki obecności szeregu elementów regulacyjnych typu „*enhancer*” w 40 kb regulatorowym odcinku tego genu.

W drugim etapie rozwoju larwy rozpoczyna się proces różnicowania komórek. Zarówno postęp cyklu komórkowego, jak i tempo wzrostu komórek w tym okresie uzależnia się od dostępu materiałów odżywczych, które może zdobyć larwa. W komórkach larwy ustają mitozy, a decyzja o rozpoczęciu nowego cyklu komórkowego zapada przed inicjacją replikacji DNA (na przejściu z fazy G1 do fazy S). Zahamowanie podziałów komórkowych przy powtarzających się fazach S powoduje, że komórki wchodzi w okres endoreplikacji. W wyniku tego procesu wielokrotnie wzrasta zawartość DNA w tych komórkach. Endoreplikacja zapewnia ciągłość przebiegu cyklu komórkowego przy zachowaniu stałej ilości komórek. Zjawisku temu towarzyszy olbrzymi przyrost tkanek stanowiących większość masy ciała larwy w tym okresie. Biorą w tym udział między innymi komórki gruczołów ślinowych, przewodu pokarmowego, ciała tłuszczowego i cewek Malpighiego. Można śmiało twierdzić, że larwa rośnie tak szybko właśnie dzięki procesowi endoreplikacji.

Trzeci typ kontroli embrionalnego cyklu komórkowego pojawia się w rosnących dyskach imaginalnych wytwarzających poszczególne części organizmu *imago*. Kontrola przebiegu tych cykli komórkowych bardzo się komplikuje. Decyzja o rozpoczęciu nowego cyklu poprzedza zarówno przejście z fazy G1 do S, jak i z G2 do M. Komórki stają się wrażliwe na zewnętrzne bodźce regulujące proliferację, różnicowanie i determinację wzoru budowy poszczególnych organów. Zaobserwowano wprostproporcjonalną zależność pomiędzy stymulacją wzrostu rozmiarów komórek dysków imaginalnych i stymulacją podziałów na przejściu G1/S. Pozytywny udział mają w tej regulacji kinaza Pi3I i proto-onkogeny Myc i Ras stymulujące wzrost rozmiarów komórek (a tym samym i całego dysku). Właśnie wzrost komórki włącza post-transkrypcyjną kontrolę poziomu cykliny E, która łączy się z kinazą Cdk2 i jest głównym czynnikiem limitującym rozpoczęcie fazy S. Podobnej regulacji podlega ekspresja fosfatazy Cdc25, regulującej przejście G2/M. Nie znamy mechanizmu odpowiedzialnego za odczytywanie i przekazywanie informacji dotyczącej wzrostu komórki. W laboratorium Bruce'a Edgara zidentyfikowano ostatnio serie mutantów *Drosophila* obciążonych autonomicznymi (wewnątrzkomórkowymi) i nieautonomicznymi (zewnątrzkomórkowymi) defektami wzrostu larwy [3]. Analiza tych mutantów pozwoli zapewne w najbliższej przyszłości zrozumieć zależności pomiędzy kontrolą wzrostu rozmiarów komórek i determinacją rozmiarów całego organizmu. Dzięki badaniom tych mutacji może uda się też poznać, w jaki sposób odbywa się dialog pomiędzy maszyną kontrolną cyklu komórkowego i procesem różnicowania.

Ciekawy przykład wspólnej kontroli wzrostu i proliferacji komórek przedstawił Wolf Reik z *Babraham Institute* w Cambridge, Wielka Brytania. Jego laboratorium bada mechanizm *imprintingu* (wdrukowania) genomu ssaków. Proces ten polega na epigenetycznym (niezmieniającym sekwencji nukleotydów w genomie) nazna-

czeniu w specyficzny sposób niektórych sekwencji DNA komórek rozrodczych. *Imprinting* powoduje zróżnicowaną ekspresję genów pochodzących od ojca i od matki. Dochodzi do tego dzięki temu, że inny typ naznaczenia genów wykształca się w genomie spermatogonium i oogonium. Diploidalny zarodek dziedziczy połowę genomu pochodzącą od ojca naznaczoną imprintingiem typu męskiego i połowę od matki naznaczoną imprintingiem typu żeńskiego. Wydaje się, że metylacja DNA odgrywa ważną rolę w tym procesie.

Wolf Reik bada geny zgromadzone w specyficznym *locus* chromosomu 7 myszy i chromosomu 11 człowieka. Mutacje w badanych regionach chromosomów wywołują chorobowy syndrom Beckwith-Wiedemanna (BWS). Syndrom ten przejawia się między innymi zmianą rozmiarów noworodków. Zarówno noworodki myszy, jak i człowieka obarczone syndromem Beckwith-Wiedemanna są o wiele większe od swoich normalnych rówieśników. W laboratorium Wolfa Reika zidentyfikowano, zarówno u myszy jak i u człowieka, serie genów związanych właśnie z regulacją wzrostu i proliferacją komórek. Są to między innymi geny kodujące IGF2 (ang. *insulin growth factor 2*) i p57^{kip2} (jeden z inhibitorów CDK). Okazało się, że istnieje rodzaj dialogu pomiędzy genami w tym regionie. Dialog ten jest zależny od imprintingu obszarów regulatorowych tych genów. Wykazano, że odpowiednia metylacja "enhancerów" tych genów wzmacnia ich ekspresję, podczas gdy metylacja wyłącznie ojcowskich "silencerów" powoduje wyciszenie ich ekspresji. Eliminacja poszczególnych elementów kontrolnych tych genów przez mutacje typu "knock-out" pozwolą zapewne na szybką identyfikację dalszych etapów kontroli wzrostu i podziałów komórek w zarodkach. Badania Wolfa Reika sugerują, że imprinting może być ważnym mechanizmem wpływającym na kontrolę cyklu komórkowego podczas rozwoju zarodków ssaków.

O centralnej roli inhibitorów enzymów CDK w kontroli proliferacji i wzrostu mówili również Christian Lehner z Uniwersytetu w Bayreuth w Niemczech pracujący na *Drosophila melanogaster* i Martin Raff z *University College of London* w Wielkiej Brytanii. Ten ostatni pracuje nad regulacją proliferacji i różnicowania prekursorów oligodendrocytów w mózgzach szczurów i myszy.

Martin Raff wykazał, że liczebność oligodendrocytów w mózgu determinuje zarówno liczba podziałów komórek prekursorowych poprzedzająca różnicowanie, jak i intensywność apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórek. Proliferacja komórek prekursorowych w hodowli *in vitro* wymaga dostarczania z zewnątrz PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) i jednego z hormonów tarczycy. Ale nawet przy stałej ilości tych czynników w pewnym momencie komórki prekursorowe przestają się dzielić i rozpoczynają różnicowanie w oligodendrocyty. Wykazano w ten sposób, że istnieje wewnętrzny zegar regulujący wstrzymanie cyklu komórkowego i włączenie programu różnicowania. Głównym składnikiem tego zegara okazało się białko p27^{kip1} – będące inhibitorem enzymów z grupy CDK. Zwiększenie ilości p27^{kip1} w prekursorach oligodendrocytów przedwcześnie zatrzymuje cykl

komórkowy i przyspiesza rozpoczęcie różnicowania. Natomiast prekursorzy uzyskane z mózgow myszy pozbawionych genu kodującego to białko przechodzą o 1 do 2 podziałów więcej przed rozpoczęciem procesu różnicowania niż komórki pochodzące z mózgow myszy kontrolnych. Laboratorium Martina Raffa kontynuuje badania nad mechanizmem procesów biorących udział w tym aspekcie kontroli rozwoju mózgu. Jest już dziś jasne, że p27^{kip1} działa nie tylko jako inhibitor cyklu komórkowego poprzez inhibicję enzymów CDK, ale również aktywnie włącza proces różnicowania. Oba procesy wymagają uzyskania precyzyjnych informacji o rozmiarach komórki. Można sądzić, że najważniejszym odkryciem najbliższej przyszłości w tej dziedzinie będzie więc identyfikacja mechanizmów pozwalających komórce na prawidłową interpretację sygnału o jej własnych rozmiarach.

Bardzo ciekawym zagadnieniem w biologii rozwoju jest rola i mechanizm asymetrycznych podziałów komórek. Nierównocenny rozdział pewnych czynników podczas podziału komórkowego leży bardzo często u podstaw wytwarzania specyficznych linii komórkowych w trakcie rozwoju organizmu. Na londyńskiej konferencji przedstawiono dane dotyczące trzech modeli podziałów asymetrycznych: prekursorów neuronów *Drosophila melanogaster*, pierwszego podziału bruzdkowania *Caenorhabditis elegans* i tworzenia się komórek kory nerwowej w mózgu ssaków.

William Chia z *National University of Singapore* przedstawił nam, w jaki sposób asymetryczny podział komórek prekursorowych neuronów u *D. melanogaster* dokonuje się dzięki asymetrycznej lokalizacji kompleksu białkowego zawierającego między innymi białka: Bazooka (Baz), Inscuteable (Insc) i Partner of Inscuteable (Pins). Stopniowe tworzenie się kompleksu w komórce rozpoczyna się przez akumulację białka Bazooka. Proces ten odbywa się w komórkach prekursorowych tworzących nabłonek. Asymetryczny podział tych komórek jest niezbędny do wykształcenia się neuronów. Pojawienie się w komórkach drugiego elementu – produktu genu *inscuteable* następuje w czasie, gdy prekursor neuronu wysuwa się z nabłonka (proces delaminacji). Dołączenie do kompleksu białka Pins następuje łącznie z wejściem komórki prekursorowej w mitozę i determinuje asymetryczne położenie wrzeciona podziałowego. Bill Chia stara się zrozumieć, w jaki sposób następuje synchronizacja pojawiania się kolejnych elementów kompleksu i jaki jest wpływ tego kompleksu na procesy morfogenetyczne i przebieg cyklu komórkowego. Chce również poznać, w jaki sposób odbywa się przekazywanie informacji pomiędzy asymetrycznym kompleksem zawierającym Baz, Insc i Pins a wrzecionem podziałowym i cytoszkieletem odpowiedzialnym za przemieszczenie wrzeciona w komórce mitotycznej.

Jednym z kandydatów do regulacji tego skomplikowanego procesu jest specyficzna forma głównego regulatora mitozy – produktu genu *cdc2*. Bill przedstawił wstępne wyniki badań mutantów *cdc2*, u których obserwuje się przekształcenie podziałów asymetrycznych w symetryczne. Jednym z nich jest mutant E51Q. Zmiana

w charakterystycznej dla enzymów CDK sekwencji PSTAIRE u tego mutantu zaburza asymetryczny podział prekursorów neuronów prowadząc do utworzenia dwóch równorzędnych komórek potomnych. Identyfikacja innych mutantów genu *cdc2* pozwoli zapewne na poznanie, w jaki sposób białko Cdc2 (i w połączeniu z którą cyklina, A lub B) wpływa na regulację symetrii podziału komórki.

Świetnym modelem badań asymetrii podziału komórkowego jest pierwszy podział brudzkowania zarodka *C. elegans*. Badania nad tym właśnie modelem przedstawił Pierre Gönczy z EMBL w Heidelbergu w Niemczech. W zygocie tego nicienia, początkowo symetrycznie ustawione wrzeciono podziałowe ulega przemieszczeniu w kierunku tylnego bieguna zarodka. Następuje to w trakcie anafazy B (tj. w trakcie wydłużania wrzeciona podziałowego towarzyszącego rozdziałowi chromosomów). Dla zapewnienia asymetrii tego podziału niezbędna jest subkortkalna lokalizacja białka PAR3 na biegunie przednim zarodka i kompleksu białek PAR1 i PAR2 na jego biegunie tylnym. Badając mutanty *C. elegans* Pierre wykazał, że mutacja w genie *zyg-8* zaburza polarność zygoty i zakłóca normalny przebieg anafazy B. Produkt genu *zyg-8* reguluje stabilność mikrotubul (głównych elementów cytoszkieletu tworzącego wrzeciono mitotyczne) jedynie w trakcie anafazy. Gen *zyg-8* koduje ewolucyjnie konserwowane białko towarzyszące mikrotubulom (MAP – ang. *Microtubule Associated Protein*). Mutacje w ludzkim genie, kodującym podobne białko o ang. nazwie *doublecortin* a gromadzące się w naszych neuronach, prowadzą do chaotycznej migracji komórek i do zaburzeń w rozwoju mózgu. Badania Pierre'a Gönczego wykazują więc, że w trakcie podziału komórkowego regulacja stabilności mikrotubul poddana jest bardzo subtelnej kontroli. Co więcej, dokładna regulacja tego procesu okazuje się niezwykle ważna dla zapewnienia asymetrii pierwszego podziału zygoty – niezbędnego elementu normalnego rozwoju zarodka *C. elegans*.

Trzecim doniesieniem na temat asymetrycznych podziałów komórkowych była prezentacja Bruce'a Schaara ze *Stanford University* w USA. Bruce Schaar pracuje nad wyjaśnieniem mechanizmów podziału komórek prekursorowych neuronów kory mózgowej fretki. Komórki te muszą „dokonać wyboru”, czy podzielią się symetrycznie dając dwie równorzędne komórki prekursorowe zachowujące nadal zdolności podziału, czy też asymetrycznie dając jedną komórkę prekursorową (zachowującą zdolność do podziału) i jedną rozpoczynającą różnicowanie w neuron i zatrzymującą postęp cyklu komórkowego. Wybór ten ma kapitalne znaczenie dla prawidłowego wykształcenia się kory mózgowej ssaków.

Podział symetryczny jest horyzontalny w stosunku do płaszczyzny nabłonka, zaś podział asymetryczny jest wertykalny. Co więcej, po takim podziale wyłącznie komórka apikalna (a nie bazalna – pozostająca nadal prekursorem) przemieści się aktywnie wzdłuż pionowej wypustki komórkowej i zasiedli odpowiednią warstwę kory mózgowej. Asymetryczny podział, który odbywa się dzięki mechanizmowi podobnemu do przedstawionego przez Billa Chia u *Drosophila melanogaster*, jest nie tylko związany z wytworzeniem dwóch różnych komórek, ale również de-

terminuje wzór zachowania się obu komórek potomnych: osiadłego prekursora jak i szybko migrującego i różnicującego się neuronu.

Pozostałymi uczestnikami konferencji byli: Jim Maller pracujący nad regulacją przebiegu dojrzewania mejotycznego i wczesnych podziałów zarodka *Xenopus laevis*; Kim Nasmyth, który przedstawił wyniki badań nad mechanizmami kontrolującymi przebieg mejotycznego rozdzielania chromosomów; Peter Bryant, który przedstawił wyniki identyfikacji białek nazwanych przez niego IDGFs (ang. *Imaginal Disc Growth Factors*) regulujących wzór podziałów komórkowych w dyskach imaginalnych *Drosophila melanogaster*; Victor Ambros studiujący regulację cyklu komórkowego w trakcie późnego rozwoju zarodkowego *C. elegans*; Jean Gautier badający mechanizm kontroli typu „checkpoint” w trakcie rozwoju *Xenopus laevis*; Rudiger Simon pracujący nad kontrolą cyklu komórkowego merystemu roślin (mutanty *Clavata* i *Wuschel*) i autor tego sprawozdania, który przedstawił, w jaki sposób regulowane są zmiany w kontroli cyklu komórkowego we wczesnym rozwoju zarodkowym myszy.

MECHANIZMY REGULUJĄCE FAZĘ M CYKLU KOMÓRKOWEGO

Głównym tematem konferencji w Roscoff zorganizowanej przez Bernarda Maro z Paryża była regulacja fazy M. Ponieważ konferencja zgromadziła ponad 100 naukowców, w tym sprawozdaniu skrótkowo opiszemy tylko kilka wybranych, najbardziej spektakularnych odkryć.

Tegoroczna konferencja dedykowana była 30-leciu odkrycia MPF przez Yoshio Masui. Sam 68-letni Yoshio Masui (od 3 lat na emeryturze, lecz ciągle aktywny naukowo) przybył do Roscoff i przedstawił wyniki badań nad zmianami w regulacji cyklu komórkowego w trakcie rozwoju zarodka *Xenopus laevis*. Model Yoshio zakłada, że transformacja wczesnego, stosunkowo prostego cyklu komórkowego (złożonego wyłącznie z faz S i M) w złożony cykl komórkowy (z fazami G1, S, G2 i M) pojawiający się w stadium blastuli, wymaga dialogu pomiędzy mechanizmami monitorującymi rozmiary komórki i mechanizmami aktywującymi MPF. Nie znany jest mechanizm molekularny tego dialogu.

Akos Sveiczer z Uniwersytetu Budapesztańskiego na Węgrzech przedstawił matematyczny model regulacji oscylacji aktywności MPF u drożdży. Sugeruje on, że podobny dialog, jaki opisał Yoshio Masui w zarodkach *X. laevis*, odbywa się także w innych komórkach.

Jonathon Pines z Cambridge w Wielkiej Brytanii przedstawił czterowymiarowy model kontroli procesu mitozy przez regulujące aktywność enzymów CDK cykliny mitotyczne. Dzięki użyciu metod ekspresji chimerowych mRNA kodujących cykliny A lub B i sprzężonych z fluoryzującym białkiem GFP Jonathon Pines śledzi w

żywych komórkach zmiany lokalizacji i ilości tych białek. Cyklina B1 lokalizuje się głównie wzdłuż mikrotubul, podczas gdy cyklina B2 w błonach aparatów Golgiego. Wydaje się, że odpowiedni typ lokalizacji reguluje aktywność związanych z cyklinaami enzymów CDK. W komórkach somatycznych, będących obiektem badań w laboratorium Jonathona Pinesa, utworzenie kompleksu Cdc2/cyklina A2 jest niezbędne do rozpoczęcia mitozy. Degradacja cykliny A2 zaczyna się już w 3–6 minut od inicjacji rozpadu otoczki jądrowej, czyli na samym początku mitozy. Eksperymentalne zwiększenie ilości cykliny A2 w komórce powoduje wydłużenie czasu tworzenia wrzeciona metafazowego (wydłużenie prometafazy). Połączenie cykliny A2 z CDK wydaje się regulować również losy tej cykliny, gdyż zmutowane białko nie wiążące CDK jest degradowane dopiero podczas przejścia z metafazy do anafazy. Dzięki badaniom Jonathona rozumiemy lepiej, jak odbywa się czasowa i przestrzenna regulacja procesu mitozy.

Christian Lehner z Uniwersytetu w Bayreuth w Niemczech przedstawił na przykładzie mitoz zarodkowych *Drosophila melanogaster* rolę sekwencyjnej degradacji cyklin mitotycznych. Degradacja cykliny A w komórkach zarodków *Drosophila melanogaster* wymaga obecności białka Fizzy (FZY). Przedstawiony przez Christiana model sugeruje, że białko to łączy się w profazie w kompleks z produktem genu *cdc20*, białkiem „checkpointu” Mad2, kompleksem APC/cyklosom i z cykliną A. Aktywacja MPF na początku mitozy powoduje dołączenie do kompleksu cykliny B (związanej z CDK) i równoczesne oddzielenie się białka Mad2. Taki mechanizm zapewniałby inaktywację punktu kontrolnego typu „checkpoint” podczas inicjacji metafazy. Innym białkiem, którego degradacja (ściśle skorelowana z degradacją cyklin) umożliwia rozdział chromosomów w trakcie anafazy, jest produkt genu *pimless* (PIM). PIM zachowuje się jak mitotyczna cyklina, tzn. jego degradacja wymaga również obecności FZY. Ciekawe, że w komórkach zatrzymanych eksperymentalnie w fazie M, cyklina A ulega degradacji, a nie ulega jej PIM. PIM może więc być u *Drosophila melanogaster* odpowiednikiem sekury (ang. *securins*) białek zidentyfikowanych u drożdży, a zabezpieczających przed przedwczesnym rozdzieleniem chromatyd.

Innym regulatorem zarówno rozpoczęcia mitozy, jak i dalszych jej etapów jest Plk (kinaza polo). Roli tego białka w kontroli mitozy i w rozdziale centrosomów poświęcił swoje wystąpienie David Glover z Cambridge w Wielkiej Brytanii. Substratami kinazy polo u *Drosophila melanogaster* są między innymi fosfataza Cdc25 aktywująca Cdc2, kinezyzna Pavarotti i trzy różne białka typu MAP. Jednym z tych ostatnich jest produkt genu *asp* niezbędny do tworzenia biegunów wrzeciona, podobnie jak sam produkt genu *polo*. Sugeruje to, że funkcja Asp może być zależna właśnie od fosforylacji przez kinazę polo. Analiza trzech różnych mutantów genu *polo* (*polo1*, 9, 10) pozwala sądzić, że poszczególne funkcje tej kinazy są zależne od różnych regionów tego niezwykle ważnego białka regulatorowego mitozy. Porównanie tylko tych trzech mutantów sugeruje, że dalsze badania zarówno mutantów

kinazy polo, jak i jej substratów (np. Asp) pozwolą wkrótce na rozszyfrowanie niezwykle złożonej roli tego białka w kontroli mitozy.

Nowo zidentyfikowanej kinazie – Nek2 lokalizującej się na centrosomach tworzących bieguny wrzeciona podziałowego poświęcili swoje wystąpienia Andrew Fry z Uniwersytetu z Leicester w Wielkiej Brytanii i Erich Nigg z Instytutu Maxa Plancka w Martinsried w Niemczech. Andrew Fry przeprowadził doświadczenia polegające na usuwaniu Nek2 z ekstraktu bezkomórkowego oocytów *Xenopus laevis*. Wykazał w ten sposób, że kinaza Nek 2 bierze udział w organizowaniu mikrotubul przez centrosomy.

Badania Ericha Nigga wykazały, że Nek2 fosforyluje inne białko o nazwie C-Nap1. Jest ono lokalizowane również na centrosomach, ale jedynie w trakcie interfazy. C-Nap1 występuje w materiale łączącym dwie centriole centrosomu w trakcie interfazy. Przed rozpoczęciem mitozy „łącznik” zawierający to białko zanika.

Prace obu naukowców sugerują, że zarówno kinaza Nek2, jak i jej substrat C-Nap1 biorą udział w regulacji funkcji centrosomów w trakcie interfazy i są niezbędne do prawidłowego formowania centrosomu bezpośrednio po zapłodnieniu.

Prawdziwym zaskoczeniem dla uczestników konferencji w Roscoff było doniesienie Michela Bornensa z Instytutu Curie w Paryżu. Prześledził on ruchy dwóch centriol budujących centrosom komórki dzięki użyciu znacznika w postaci białek centriolarnych połączonych z GFP (np. GFP::centryna). Śledził on ruchy centriol w całych komórkach i w cytoplasmach uzyskanych przez odcięcie części komórki zawierającej jądro. Okazało się, że tor i amplituda ruchu obu centriol zmieniają się w trakcie cyklu komórkowego. Jedna z centriol jest wyraźnie bardziej ruchliwa niż druga. Okazało się, że centriola nieruchliwa to dojrzała centriola-matka, a ruchliwa to centriola potomna. Co więcej, obserwacje Michela wykazują niezbicie, że jedynie dojrzała centriola-matka zachowuje się jak właściwy centrosom kontrolując tworzenie się mikrotubul. Jest to bardzo ważne odkrycie, które będzie miało z pewnością ogromny wpływ na identyfikację funkcji centrosomów i centriol.

Michael Glotzer z Uniwersytetu Wiedeńskiego przedstawił wyniki badań nad mutantami cytokinezy w zygocie *C. elegans*. Mutant *cyk-4* nie jest w stanie zakończyć cytokinezy pierwszego podziału zygoty i wykazuje defekty w budowie wrzeciona podziałowego. Cyk-4 jest białkiem aktywującym GTPazę. Michael Glotzer przedstawił dane świadczące o tym, że zablokowanie GTPaz zaburza asymetrię pierwszego podziału bruzdkowania *C. elegans*. Białko Cyk-4 gromadzi się w centralnej części wrzeciona podziałowego w trakcie anafazy zygoty i blastomerów zarodka. Pozostając w tych regionach po podziale jest trwałym znacznikiem miejsca, w którym zaszła cytokineza. U mutantów *cyk-4* lokalizacja ta jest zaburzona. Partnerem białka Cyk-4 jest białko Zen-4 (homolog produktu genu *pavarotti D. melanogaster*). Dalsze prace wykażą zapewne, w jaki sposób oba białka współpracują ze sobą w procesie kontroli późnej anafazy i cytokinezy.

Roger Karess z „CNRS ” w Gif-sur-Yvette we Francji przedstawił bardzo frażujące badania nad produktami genów *rough-deal* i *zest-white10* u *D. melanogaster*. W trakcie mitozy oba białka są zgrupowane na kinetochorach chromosomów. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że białko Rough-deal przyłacza się jedynie do mikrotubul podlegających napięciu mechanicznemu. Białko to rozprzestrzenia się wzdłuz wiązki mikrotubul kinetochorowych po osiągnięciu przez kinetochor stabilnej pozycji w płycie wrzeciona metafazowego. Jest to pierwszy przykład białka kinetochorowego, które wędruje wzdłuz mikrotubul w kierunku centrosomu w trakcie metafazy. Może być ono przekąźnikiem informacji o prawidłowym napięciu mechanicznym wiązki kinetochorowej mikrotubul w trakcie tworzenia funkcjonalnego wrzeciona metafazowego. Zarówno białko Rough-deal, jak i Zest-White10, które tworzą wspólny kompleks, wydają się być nowymi skłdnikami systemu kontroli typu „*checkpoint*”.

Innemu białku wrzeciona podziłowego poświęcił swoje wystąpienie Andrew Murray z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco w USA. Badając białka, które gromadzą się na chromosomach w trakcie podziáłu, natrafił na białko o masie molekularnej 74 kDa. Białko to lokalizuje się na chromosomach metafazowych, a znika całkowicie z chromosomów anafazowych. Andrew wyizolował to białko i sklonował kodujący go gen. Białko o nazwie Xkid nalezy do grupy kinezyn, czyli motorów komórkowych. Usunięcie Xkid z ekstraktu bezkomórkowego oocytów *Xenopus* nie przeszkadza w tworzeniu wrzeciona podziłowego. Powoduje jednak, że chromosomy są rozciągnięte wzdłuz wrzeciona w formie bezładnych wstęg. Co więcej, miejscami przyczepu ciągnących chromosomy mikrotubul wcale nie są wówczas kinetochory, lecz regiony pozakinetochorowe. Uzupelnienie ekstraktu wyprodukowanym przez bakterie rekombinacyjnym białkiem Xkid przywraca całkowicie normalne relacje chromosom-wrzeciono. Zanik Xkid w anafazie jest spowodowany jego degradacj proteolityczną. Wydaje się, że główną rolę tej kinezyny moze być zabezpieczenie chromosomów metafazowych przed nieprawidłowym podciępieniem mikrotubul wrzeciona.

W trakcie sesji poświęconej mejozie na szczególną uwagę zasłuzyło wystąpienie Marcela Dorée z CRBM w Montpellier we Francji i Jima Mallera z *University of Denver* w USA.

Marcel Dorée przedstawił wyniki badań dokonanych wraz z Danielem Fisherem nad rol białka Hsp 90 w procesie aktywacji kinazy Mos. Białko to jest niezbędne do wykształcenia aktywności CSF (ang. *CytoStatic Factor*) odpowiedzialnej za zablokowanie oocytów kręgowców w metafazie drugiego podziáłu mejotycznego. Badania obu naukowców wykazały równie, że aktywacja MAP kinazy ERK2 (ang. *Extracellularly Regulated Kinase 2*) nie jest niezbędna do aktywacji MPF podczas wejścia oocytów *Xenopus* w pierwszą fazę M mejotyczn. Podobnych obserwacji dokonano przedtem na oocytach myszy. Wydaje się więc, że zarówno oocyty *Xenopus*, jak i myszy nie wymagają MAP kinazy do samej aktywacji MPF, a enzym

ten jest niezbędny do stabilizacji aktywności MPF w trakcie dojrzewania mejo-tycznego oocytów.

Jim Maller przedstawił wyniki badań wskazujących na rolę białka p90^{rsk} w aktywności CSF i w regulacji prawidłowego przebiegu mejozy w oocytach *Xenopus*. Białko p90^{rsk} jest substratem fosforylacji MAP kinazy ERK2. Podlega jednak również fosforylacji przez inną kinazę – PDK1 (ang. *Phosphatydyl-inosytol Dependent Kinase 1*). Konieczność podwójnej fosforylacji p90^{rsk} przez dwie kinazy aktywowane przez dwa odmienne szlaki sygnalizacyjne sugeruje, że trudności z identyfikacją CSF (odkrytego przez Yoshio Masui w 1971 i opisanego jako aktywność cyto-plazmatyczna w tej samej publikacji, w której opisano MPF) mogą być spowodowane bardzo skomplikowanym mechanizmem jego aktywacji. Nie znamy ciągle pełnej natury enzymatycznej CSF. Nie wiemy też, w jaki sposób CSF działa na MPF. Najbliższe lata przyniosą zapewne odpowiedź i na to pytanie postawione przed 30 laty przez Yoshio Masui. Podejrzewa się, że jednym z substratów czynnika cytostatycznego jest przynajmniej jedno z licznych białek regulujących rozpoznawanie i degradację cyklin lub też któreś z białek kinetochorowych odpowiedzialnych za wywołanie ruchu anafazowego chromosomów. Pełna identyfikacja CSF i poznanie mechanizmu jego działania na MPF pozwoli zarówno na lepsze zrozumienie procesu mejozy, jak i regulacji procesów inaktywacji MPF i rozdziału chromosomów w trakcie podziału komórkowego. Dlatego jest to jedno z najbardziej frapujących pytań, jakie stawiają sobie dzisiaj naukowcy badający kontrolę cyklu komórkowego.

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję Dr Marii Annie Ciemerych i Mgr Alinie Zalewskiej za bardzo cenne dyskusje, uwagi i korektę tekstu.

LITERATURA

- [1] MASUI Y, MARKERT CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; **177**(2): 129–145.
- [2] The Cell Cycle and Development. Nurse P. (red.), John Wiley & Sons Ltd., London 2001.
- [3] GALLONI M, EDGAR BA. Cell-autonomous and non-autonomous growth-defective mutants of *Drosophila melanogaster*. *Development* 1999; **126**(11): 2365–2375.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 30.06. 2000 r.

Przyjęto: 10.07. 2000 r.

CNRS UPR 41, Université Rennes, Biologie et Génétique du Développement,
Faculté de Médecine, 2 av Prof. Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, Francja
e-mail: Jacek.Kubiak@univ-rennes1.fr

MECHANIZMY FRAGMENTACJI DNA I KONDENSACJI CHROMATYNY W KOMÓRKACH ULEGAJĄCYCH APOPTOZIE

MECHANISMS OF DNA FRAGMENTATION AND CHROMATIN CONDENSATION IN CELLS UNDERGOING APOPTOSIS

Piotr WIDŁAK

Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii, Gliwice

Streszczenie: Jednym z procesów biochemicznych typowych dla programowanej śmierci komórki (apoptozy) jest degradacja DNA, odbywająca się w dwu kolejno następujących etapach. Degradacja chromatyny do fragmentów oligonukleosomowych poprzedzona jest wycinaniem z chromosomów fragmentów o długości 50 (i więcej) tysięcy par zasad. Z fragmentacją DNA związana jest kondensacja chromatyny obserwowana w komórkach ulegających apoptozie. Jedną z nukleaz odpowiedzialnych za fragmentację DNA w trakcie apoptozy jest DFF40/CAD. Aktywacja nukleazy DFF40/CAD polega na katalizowanej przez kaspazę-3 degradacji inhibitora nukleazy, białka DFF45/ICAD. Inne nukleazy mogące brać udział w apoptotycznej fragmentacji DNA to między innymi NUC18, DNaza I i DNaza II. Z pierwszym etapem degradacji DNA związana jest prawdopodobnie aktywność topoisomerazy II DNA. (*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 583–597)

Słowa kluczowe: Apoptoza; nukleazy; kaspazy; chromatyna.

Summary: Sequential cleavage of genomic DNA into large-scale DNA fragments of 50-kb, followed by formation of mono- and oligonucleosomal DNA fragments, is a biochemical hallmark of apoptosis. Chromatin condensation is correlated with apoptotic DNA fragmentation. One of the nucleases primarily responsible for DNA cleavage is called DFF40/CAD. DFF40/CAD is activated by caspase-3 that cuts the nuclease inhibitor DFF45/ICAD. Other nucleases (e.g. NUC18, DNase I and DNase II) have been also postulated to be involved in apoptosis. Formation of large-scale DNA fragments is potentially mediated by DNA topoisomerase II. (*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 583–597)

Key words: Apoptosis; nucleases; caspases; chromatin.

Wykaz skrótów: **AIF** (ang. *apoptosis inducing factor*) – białko mitochondrialne indukujące apoptozę; **bp** – para nukleotydów; **CAD** (ang. *caspase-activated DNase*) – DNaza aktywowana przez kaspazę; **CIDE** (ang. *cell death inducing DFF45-like effector*) – białko indukujące apoptozę; **DAPI** – diamidino-2-fenylindol; **DFF** (ang. *DNA fragmentation factor*) – białko indukujące fragmentację DNA; **DNA-PK** – kinaza białkowa zależna od DNA; **FAS** – receptor błonowy z rodziny TNF; **FADD** (ang. *FAS associated protein with death domain*) – białko adaptorowe wiążące się z receptorem FAS; **fragmenty HMW** (ang. *high molecular weight*) – fragmenty DNA o dużej masie; **ICAD** (ang. *inhibitor of CAD*) – inhibitor nukleazy CAD; **kb** – tysiąc par nukleotydów; **LEI** (ang. *leukocyte elastase inhibitor*) – inhibitor elastazy z leukocytów; **kDa** – tysiąc atomowych jednostek masy; **MAR/SAR** (ang. *matrix attached region/scaffold associated region*) – sekwencje DNA oddziałujące ze szkieletem jądrowym.

I. WSTĘP

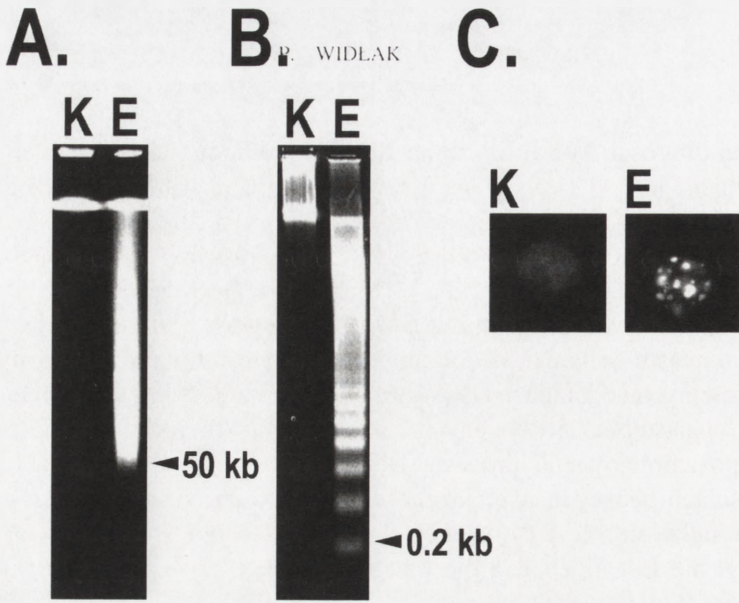
Programowana śmierć komórki, czyli inaczej apoptoza, jest procesem umożliwiającym usuwanie zbędnych komórek w trakcie różnicowania i organogenezy. Dodatkową rolą apoptozy jest eliminacja z organizmu komórek nieprawidłowych (na przykład nowotworowych) lub uszkodzonych. Apoptoza jest aktywnym procesem autodestrukcyjnym, kontrolowanym przez szereg genów i wymagającym aktywacji odpowiednich białek. Jedną ze zmian biochemicznych swoistych dla procesów apoptozy jest aktywacja proteaz cysteinowych, kaspaz. Aktywacja kaspaz odbywa się w kaskadzie, w której nieaktywne zymogeny aktywowane są w drodze ograniczonej proteolizy. Substratami kaspaz są liczne białka cytoplazmatyczne i jądrowe. Kaspazy można podzielić na dwie grupy: zawierające tzw. dużą „prodomenę” kaspazy „inicjujące” oraz zawierające małą „prodomenę” kaspazy „wykonawcze”. Przykładem kaspaz „wykonawczych” jest kaspaza-3. Jest ona aktywowana przez dwie kaspazy inicjujące: kaspazę-8 lub kaspazę-9. W piśmiennictwie polskim opublikowano liczne artykuły przeglądowe szczegółowo omawiające różne aspekty apoptozy [m.in. 2, 10, 11, 12, 20, 32, 36, 41, 47]. Niniejsza praca poświęcona jest procesowi katabolicznemu typowemu dla komórek ulegających apoptozie: fragmentacji materiału genetycznego. Z procesem fragmentacji DNA związana jest kondensacja chromatyny obserwowana w komórkach apoptotycznych, która również omówiona zostanie w pracy.

II. FRAGMENTACJA DNA JEST PROCESEM WIELOETAPOWYM, ZALEŻNYM OD STRUKTURY CHROMATYNY

W roku 1976 Skalka i współpracownicy [42], a później Wyllie w roku 1980, stwierdzili, że materiał genetyczny wyizolowany z komórek ulegających apoptozie jest zdegradowany do fragmentów o długościach odpowiadających wielokrotności DNA nukleosomowego [49]. Była to jedna z cech odróżniających proces apoptozy od śmierci nekrotycznej, w której DNA degradowany jest do fragmentów o przy-

padkowej długości. Pozwoliło to na sformułowanie hipotezy, że taka fragmentacja DNA zależna jest od swoistej nukleazy, a cały proces warunkuje przebieg apoptozy i jest typowy dla tego rodzaju śmierci komórek [1]. Obecnie wiadomo, że fragmentacja DNA w komórkach ulegających apoptozie odbywa się w kilku etapach, które w układach doświadczalnych można od siebie odseparować. Pierwszym etapem jest powstawanie dużych fragmentów DNA (ang. HMW – *high-molecular weight*) w ciągu kilkunastu–kilkudziesięciu minut po zainicjowaniu procesu. Prawdopodobnie w dwu kolejnych podetapach DNA chromosomowy cięty jest na fragmenty o długości ok. 300, a następnie 50 tysięcy par zasad (kb). W ciągu godziny do kilkunastu godzin po zainicjowaniu procesu, DNA ulega pocięciu do krótkich fragmentów o długościach będących wielokrotnością ok. 200 par zasad (rys. 1A i B) [21, 53]. Obecnie sądzi się, że fragmentacja DNA nukleosomowego, chociaż typowa dla apoptozy, nie jest niezbędna dla przebiegu całego procesu. Świadczy o tym fakt, że niektóre typy komórek, pomimo braku degradacji DNA do krótkich fragmentów oligonukleosomowych, umierają wykazując cechy morfologiczne typowe dla apoptozy. W komórkach tych obserwuje się jednak degradację DNA do fragmentów o wysokiej masie cząsteczkowej [21, 34, 53].

Sposób fragmentacji DNA w czasie apoptozy odzwierciedla cechy strukturalne chromatyny. Powstawanie krótkich fragmentów DNA (*laddering*) w sposób oczywisty związane jest z nukleosomową strukturą chromatyny i jest efektem cięcia przez nukleazy DNA łącznikowego znajdującego się pomiędzy nukleosomami. Przypuszcza się, że powstawanie fragmentów HMW odzwierciedla tzw. wyższorzędową strukturę chromatyny: fragmenty o długości ok. 50 kb – pętle DNA, a fragmenty o długości ok. 300 kb – struktury zawierające heksamery pętli DNA (tzw. struktury rozetowe) [24, 53]. Fragmentacja DNA jest wypadkową dwu procesów: aktywacji nukleaz i zmian struktury chromatyny, które zwiększają podatność DNA na atak białek wprowadzających pęknięcia DNA. Fragmentacja DNA nukleosomowego jest przede wszystkim wynikiem aktywacji nukleaz, natomiast zmiany struktury chromatyny (np. proteoliza histonu H1) wydaje się mieć charakter wyłącznie wspomagający. Struktura chromatyny, poprzez ekspozycję pewnych odcinków DNA na atak nukleaz, ma decydujące znaczenie dla powstawania fragmentów o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW). Aktywacja procesu apoptozy prowadzi do zmian struktury chromatyny. Przykładem może być proteoliza białek oddziałujących z DNA, na przykład histonów, lamin i białek macierzy jądrowej, katalizowana między innymi przez kaspazy [4, 45]. Struktura chromatyny jest czynnikiem regulującym ekspresję materiału genetycznego, zaś zmiany metabolizmu komórki wymuszają zmiany struktury chromatyny [3]. Można wyobrazić sobie, że zmiany struktury chromatyny będące efektem działania białek apoptotycznych (np. kaspaz) prowadzą zarówno do fragmentacji DNA, jak i do deregulacji ekspresji genów.



nr 4, s. 586

RYSUNEK 1. Fragmentacja DNA i kondensacja chromatyny w komórkach ulegających apoptozie. DNA z kontrolnych komórek HL60 (K) i komórek HL60 traktowanych etopozydem (E) rozdzielano w elektroforezie w pulsowo zmiennym polu elektromagnetycznym (panel A) lub standardowej elektroforezie agarozowej (panel B) lub komórki utrwalano, barwiono DAPI i analizowano mikroskopowo (panel C). Stosowano 30 μ M stężenie etopozydu, komórki eksponowano 6 godzin (panel A) lub 24 godziny (panele B i C).

III. DEGRADACJA DNA DO FRAGMENTÓW HMW ODBYWAJĄCA SIĘ WE WCZESNYCH ETAPACH APOPTOZY

Mechanizmy degradacji DNA chromosomowego do fragmentów o długości 300 kb i 50 kb są stosunkowo mało poznane i do tej pory nie udało się wyizolować żadnej nukleazy swoistej dla tego procesu. Można wymienić kilka hipotez dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie fragmentów HMW.

1. W chromatynie konstytutywnie istnieją miejsca nadwrażliwe na działanie nukleaz aktywowanych w procesie apoptozy (nukleazy takie mogłyby być swoiste dla tego etapu degradacji DNA lub brać udział również w degradacji DNA nukleosomowego).
2. W trakcie apoptozy, na przykład w efekcie proteolizy białek szkieletu jądrowego, w chromatynie tworzą się miejsca nadwrażliwe na nukleazy.
3. Pod wpływem czynników indukujących apoptozę białka chromatyny, które normalnie nie wykazują aktywności nukleolitycznej, wprowadzają pęknięcia nici DNA.

4. Dwuniciowe pęknięcia DNA mogą powstawać również w wyniku bezpośredniego działania czynników genotoksycznych (na przykład promieniowania jonizującego) bez udziału swoistych białek enzymatycznych.

Aktywności enzymatyczne odpowiedzialne za powstawanie fragmentów HMW charakteryzowano w kilku układach doświadczalnych, a zebrane dane wskazują, że w procesie mogą brać udział różne białka enzymatyczne [16, 21, 53]. Szereg danych sugeruje, że w powstawaniu fragmentów HMW ma udział topoizomeraza II DNA (lub inne enzymy o podobnym mechanizmie działania). Na udział topoizomerazy II w apoptotycznej fragmentacji DNA wskazują następujące fakty:

1. Topoizomeraza II ma zdolność kowalencyjnego wiązania i odwracalnego rozszczepiania nici DNA. Jednak w pewnych warunkach (na przykład w obecności swoistych inhibitorów) działanie topoizomerazy może ulec zaburzeniu i powstają nieodwracalne pęknięcia DNA [26].
2. Część molekuł topoizomerazy II zlokalizowana jest w szkielecie jądrowym i oddziałuje z sekwencjami MAR/SAR, biorąc udział w tworzeniu pętli DNA. W obecności inhibitorów topoizomeraza II indukuje wycinanie z genomu fragmentów DNA o długości 50–300 kb w tych samych miejscach, w których obserwowano powstawanie fragmentów HMW w czasie apoptozy [24].
3. Niektóre inhibitory topoizomerazy II (np. etopozyd czy tenipozyd) są czynnikami indukującymi apoptozę.

IV. NUKLEAZY, KTÓRE MOGĄ BRAĆ UDZIAŁ W DEGRADACJI DNA DO FRAGMENTÓW OLIGONUKLEOSOMOWYCH

Analiza fragmentów DNA generowanych w trakcie apoptozy pozwoliła na ustalenie cech nukleaz zaangażowanych w ten proces. Stwierdzono, że enzymy te są endonukleazami swoistymi dla dwuniciowego DNA. Nukleazy te mają zdolność wprowadzania zarówno jednoniciowych pęknięć DNA (ang. *nick*), jak i dwuniciowych tępo zakończonych końców (ang. *blunt-end*). Wiązanie fosfodiestrowe przecinane jest w taki sposób, że grupa fosforanowa zostawiana jest po stronie 5' (5'-P), a grupa hydroksylowa po stronie 3' (3'-OH) – cecha ta wykorzystywana jest w technice *TUNEL Assay*, powszechnie stosowanej do detekcji komórek apoptotycznych. W reakcji z chromatyną nukleazy takie preferencyjnie przecinają DNA łącznikowy pomiędzy kolejnymi nukleosomami [22]. W wyniku badań trwających od trzydziestu lat wykryto kilkadziesiąt nukleaz, których aktywność pojawia się (lub wzrasta) w komórkach ulegających apoptozie. Enzymy, których aktywność związana jest z apoptozą, należą do trzech grup nukleaz:

- 1) zależnych od jonów magnezu,
- 2) zależnych od jonów wapnia i magnezu,

3) niezależnych od jonów metali.

Często jedynymi cechami wykrytych enzymów są wymagania jonów metali i ich przybliżona masa cząsteczkowa (białka te mają od 18 do 97 kDa). Informacje dotyczące nukleaz, których aktywność może być związana z apoptozą, znaleźć można w innych pracach przeglądowych [np. 22, 30, 53]. W niniejszej pracy przedstawionych zostanie jedynie kilka najlepiej poznanych enzymów, których związki z apoptozą są najlepiej udokumentowane.

1. Nukleazy zależne od jonów magnezu

DFF40/CAD. Enzym mający decydujące znaczenie dla degradacji DNA w trakcie apoptozy odkryty został przed trzema laty. Białko zostało zidentyfikowane jako czynnik indukujący fragmentację DNA w wyizolowanych jądrach i nazwane DFF (ang. *DNA fragmentation factor*) [28]. Ludzki DFF składa się z dwu podjednostek: katalitycznej o masie około 40 kDa (DFF40) i regulatorowej o masie około 45 kDa (DFF45) [27]. Odkryte niezależnie w mysie białka homologiczne z DFF nazwano CAD (ang. *caspase-activated DNase*, odpowiednik DFF40) oraz ICAD (odpowiednik DFF45) [7]. DFF40/CAD jest białkiem zasadowym zbudowanym z 345 aminokwasów. DFF45/ICAD jest białkiem kwaśnym zbudowanym z 331 aminokwasów. Dwie reszty asparaginowe znajdujące się w pozycji 117 i 224 DFF45/ICAD rozpoznawane są i trawione przez kaspazę-3 (i mniej wydajnie przez kaspazę-7). DFF45 wykazuje dwie aktywności: białka opiekuńczego (ang. *chaperone*) i inhibitora dla nukleazy DFF40. Obecność DFF45 niezbędna jest dla prawidłowego fałdowania łańcucha aminokwasowego DFF40 w trakcie jego syntezy, a DFF40 syntetyzowany w komórkach pozbawionych DFF45 tworzy nieaktywne agregaty. W komórkach nieulegających apoptozie nieaktywny heterodimer DFF40/DFF45 zlokalizowany jest w jądrach. Aktywacja kaspazy-3 i nacięcie inhibitora DFF45 w dwu swoistych miejscach jest niezbędne dla aktywacji nukleazy [7, 14, 27, 28]. Po uwolnieniu z kompleksu z DFF45, białko DFF40 tworzy aktywne homo-oligomery [29]. W komórkach występuje również krótsza forma białka DFF45 (będąca produktem tzw. „alternatywnego *splicingu*” i pozbawiona domeny C-końcowej), nazwana DFF35/ICAD-S. DFF35 jest inhibitorem DFF40, nie wykazuje jednak aktywności „opiekuńczej” [13, 38]. C-końcowa część DFF40 zawiera domenę katalityczną, a część N-końcowa domenę regulującą aktywność nukleazy [18]. DFF40 i DFF45 oddziałują ze sobą przez domeny N-końcowe; sekwencja aminokwasowa tej części obu białek wykazuje znaczny stopień homologii. Stwierdzono, że w komórkach kręgowców (a również *Drosophila melanogaster*) występują inne białka, których domeny N-końcowe wykazują homologię z N-końcowymi domenami DFF40 i DFF45. Do białek tych należą CIDE-A i CIDE-B (ang. *cell death inducing DFF45-like effector*) oraz białko Fsp27 swoiste dla komórek tłuszczowych. N-końcowa domena wspólna dla białek CIDE i DFF nazwana została CIDE-N. Białka CIDE-A i CIDE-B

indukują apoptozę, a ich aktywność hamowana jest przez oddziaływanie z DFF45 (poprzez domeny CIDE-N). Obecność ich domeny C-końcowej (domena CIDE-C) jest czynnikiem wystarczającym do zainicjowania procesu, lecz mechanizm ich działania nie jest wyjaśniony [19]. DFF40 jest endonukleazą swoistą dla dwuniciowego DNA, generującą tępo zakończone końce z grupami 3'-OH. DFF40 preferuje DNA łącznikowy generując fragmenty mono- i oligonukleosomowe, a jej aktywność stymulowana jest w obecności niektórych białek chromatyny (histon H1, HMG-1/2 oraz topoizomeraza II) [46]. O decydującym znaczeniu nukleazy DFF40/CAD dla degradacji DNA w trakcie apoptozy świadczą następujące fakty:

- 1) zgodność właściwości katalitycznych z cechami „idealnej nukleazy apoptotycznej”,
- 2) obecność w jądrach niemal wszystkich typów komórek [33],
- 3) mechanizm aktywacji wykorzystujący kaspazę-3,
- 4) brak swoistej dla apoptozy fragmentacji DNA w komórkach pozbawionych aktywnego enzymu.

Stwierdzono, że u myszy transgenicznych z usuniętym genem DFF45, u których nie dochodzi do produkcji aktywnej nukleazy DFF40, zadziaływanie czynnikami inicjującymi apoptozę nie indukuje fragmentacji DNA. Myszy takie, poza pewnymi anomaliami w rozwoju mózgu, mają prawidłowy fenotyp. Tymocyty otrzymane z takich myszy, chociaż również ulegają apoptozie, są w porównaniu z komórkami normalnymi bardziej odporne na jej indukcję i umierając wykazują inną morfologię [51, 52].

Endonukleaza G. Jedną z endonukleaz występujących powszechnie w komórkach kręgowców jest endonukleaza G. Enzym (składający się z dwu różnych podjednostek o masach około 28 kDa) trawi RNA oraz jedno- i dwuniciowy DNA i generuje końce 3'-OH. Białko znajdujące się głównie w mitochondriach, gdzie uczestniczy w replikacji mitochondrialnego DNA [6]. Endonukleaza G wykrywana jest również w jądrach komórkowych. Ostatnio stwierdzono, że we wczesnych etapach apoptozy endonukleaza G uwalniana jest z mitochondriów pod wpływem białka Bid (podobnie jak cytochrom c) i może uczestniczyć w degradacji DNA chromosomów [L. Li i X. Wang, informacja od autorska].

2. Nukleazy zależne od jonów wapnia i magnezu

NUC18 i cyklofiliny. Jedną z pierwszych nukleaz, których aktywność wykryto w apoptotycznych komórkach limfoidalnych potraktowanych glukokortykoidami, było białko o masie około 18 kDa, nazwane NUC18. NUC18 jest endonukleazą zlokalizowaną w jądrach, aktywną w neutralnym pH, hamowaną przez jony cynku i generującą końce 3'-OH. NUC18 wykazuje homologię z cyklofilinami, białkami wiążącymi cyklosporynę A i wykazującymi aktywność peptydyl-propylo *cis-trans* izomeraza. Trzy wykryte cyklofiliny (A, B, C – o masach 18, 21 i 23 kDa) mają aktywność endonukleaz i cechy podobne do NUC18. Cyklofilina C nie wymaga

jonów wapnia i po wprowadzeniu do jąder generuje fragmenty DNA o długości około 50-kb [30, 31].

DNaza I i DNaza γ . Jedną z lepiej poznanych nukleaz kręgowców jest DNaza I, białko o masie 31–34 kDa. Stwierdzono, że enzym ten produkowany jest w wielu typach komórek (a nie tylko w komórkach wydzielniczych) i wykryto jego obecność również na terenie jądra komórkowego. Ponieważ cechy enzymatyczne DNazy I odpowiadają cechom nukleaz apoptotycznych (wymienione powyżej), sugeruje się, że DNaza I może być jednym z enzymów odpowiedzialnych za fragmentację genomu w trakcie apoptozy [35]. W komórkach kręgowców występują inne białka wykazujące dużą homologię z DNazą I. W komórkach szczurów takim enzymem jest DNaza γ . Aktywny enzym ma masę około 33 kDa i zlokalizowany jest w jądrach komórek ulegających apoptozie. W komórkach nieulegających apoptozie DNaza γ występuje w formie nieaktywnego proenzymu o masie 35 kDa. Od DNazy I różni ją to, że nie jest hamowana przez aktynę i wykazuje preferencje dla DNA łącznikowego między nukleosomami [39]. Ludzkim odpowiednikiem DNazy γ jest białko DNAS1L3 [50].

3. Nukleazy niezależne od jonów metali

DNaza II. W komórkach kręgowców wykryto obecność szeregu nukleaz nie wymagających jonów magnezu lub innych metali i aktywnych w kwaśnym pH (poniżej 6,5). Najlepiej znanym enzymem z tej grupy nukleaz jest DNaza II. DNaza II jest endonukleazą preferencyjnie tnącą DNA łącznikowy i generującą końce 3'-P. Chociaż białko to zlokalizowane jest głównie w lizosomach, sugeruje się jego związek z procesami apoptozy w tych typach komórek, w których w trakcie apoptozy dochodzi do znacznego obniżenia pH [8, 40]. Ludzka DNaza II syntetyzowana jest jako białko o masie 40 kDa i ulega proteolizie (katalizowanej prawdopodobnie przez kaspazy) do formy o długości około 28 kDa [23]. DNaza II obecna w komórkach świni syntetyzowana jest jako białko o masie 42 kDa tożsame z inhibitorem elastazy z leukocytów (LEI). W komórkach apoptotycznych LEI ulega proteolizie do białka o masie 27 kDa, nie będącego inhibitorem elastazy, lecz aktywną formą DNazy II [44].

V. MECHANIZMY AKTYWACJI NUKLEAZ W KOMÓRKACH ULEGAJĄCYCH APOPTOZIE

Aktywność wszystkich nukleaz obecnych w komórkach, podobnie jak i innych enzymów katabolicznych, znajduje się pod ścisłą kontrolą uniemożliwiającą ich „nieplanowaną działalność”. Można wyobrazić sobie, że część nukleaz degradujących DNA w trakcie apoptozy aktywowana jest w wyniku swoistych mechanizmów regulujących, inne zaś aktywowane są niejako „przy okazji” zmian mających miejsce

w umierającej komórce. Użyty tutaj termin „aktywacja” obejmuje nie tylko aktywację (czy derepresję) *sensu stricto*, ale również udostępnienie DNA dla enzymów aktywnych konstytutywnie. Poniżej przedstawione są niektóre z mechanizmów mogących aktywować nukleazy w komórkach ulegających apoptozie.

1. Zmiana równowagi jonowej w komórkach ulegających apoptozie

Jedną ze zmian biochemicznych typowych dla procesu apoptozy jest obniżenie stężenia jonów potasu, głównego kationu cytoplazmatycznego. Stwierdzono, że w komórkach ulegających apoptozie stężenie potasu maleje z 140–150 mM do 35–55 mM. Takie obniżenie stężenia potasu może aktywować nukleazy z rodziny NUC18/cyklofilin, które w buforach o fizjologicznej sile jonowej wykazują słabą aktywność [17]. Wewnątrzkomórkowe stężenie potasu ma również wpływ na aktywność nukleazy DFF40/CAD, która optymalną aktywność wykazuje przy 50–100 mM stężeniu soli [Widłak, niepublikowane]. Inną zmianą typową dla apoptozy jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, z wartości nanomolowych do mikromolowych. Podane wielkości są wartościami uśrednionymi dla całej komórki, nie wiadomo, jak zmienia się stężenie wapnia w jądrach komórkowych. Jednak powszechnie przyjmuje się, że podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w trakcie apoptozy prowadzi do aktywacji nukleaz zależnych od wapnia i magnezu [1]. Zaburzenia transportu jonów w umierających komórkach prowadzą często do ich zakwaszenia. Zwykle w komórkach ulegających apoptozie obserwuje się obniżenie pH cytoplazmatycznego do 7,2–7,0, jednak w niektórych typach komórek stwierdzono obniżenie pH do wartości 6,5 [40]. Przy tej wartości pH aktywowana jest DNaza II [23] i inne nukleazy z tej grupy [8].

2. Zmiana wewnątrzkomórkowej lokalizacji nukleaz

Wiele nukleaz zamkniętych jest w strukturach cytoplazmatycznych, w których nie mają one kontaktu z DNA. Przykładem jest lokalizacja DNazy I w retikulum endoplazmatycznym, a DNazy II w lizosomach. Zmiana „fizjologicznej” lokalizacji nukleaz i ich transport do jąder może wynikać z aktywnych mechanizmów, jak w przypadku uwalniania endonukleazy G z mitochondriów, może być również efektem zmian strukturalnych mających miejsce w umierającej komórce.

3. Tworzenie kompleksów z innymi białkami

Szereg nukleaz tworzy nieaktywne kompleksy z innymi białkami komórkowymi odgrywającymi rolę inhibitorów. Przykładem mogą być kompleksy pomiędzy DNazą I i aktywną oraz kompleksy DFF40/CAD z DFF45/ICAD (omówione powyżej). Aktywacja takich nukleaz polega na usunięciu inhibitora. Podobny jest mechanizm aktywacji NUC18, który w komórkach nie ulegających apoptozie występuje w

nieaktywnym kompleksie z innymi białkami jądrowymi [30], oraz zależnych od wapnia i magnezu nukleaz z grupy endo-egzonukleaz, które w formie nieaktywnej tworzą kompleksy z białkami szkieletu jądrowego [9]. Nukleazy mogą być również aktywowane poprzez tworzenie kompleksów. Przykładem jest nukleaza DFF40/CAD, tworząca aktywne homo-oligomery i stymulowana poprzez oddziaływanie z histonem H1 [29].

4. Aktywacja nukleaz zależna od proteaz

Szereg nukleaz występuje w postaci nieaktywnych proenzymów (zymogenów) i jest aktywowana w wyniku ograniczonej proteolizy. Aktywacja taka zależna jest zwykle od kaspaz, jednak mogą w niej uczestniczyć również inne proteazy (na przykład elastaza czy granzym B). Do nukleaz aktywowanych w wyniku ograniczonej proteolizy należą: DNaza γ [39], DNaza II [23, 44] czy endo-egzonukleazy [9]. Zależna od proteaz aktywacja nukleaz może polegać również na proteolizie ich inhibitorów, na przykład katalizowanej przez kaspazy proteolizie aktyny (inhibitor DNazy I) lub DFF45/ICAD (inhibitor DFF40/CAD; omówione powyżej). Dodatkowo, proteazy aktywowane w trakcie apoptozy (kaspazy, granzym B, proteazy serynowe macierzy jądrowej) katalizują proteolizę białek chromatyny i w ten sposób zwiększają dostępność i podatność DNA na działanie nukleaz.

5. Synteza *de novo* i modyfikacje posttranslacyjne nukleaz

W trakcie apoptozy ma miejsce aktywacja szeregu genów. Nie jest jednak jasne, czy do białek swoście syntetyzowanych po inicjacji apoptozy należą nukleazy. Wiadomo jednak, że w pewnych układach doświadczalnych podanie cykloheksimidu, inhibitora syntezy białek, nie blokuje apoptozy i fragmentacji DNA [22, 53]. Jednym z mechanizmów regulacji aktywności białek jest kowalencyjna modyfikacja reszt aminokwasowych, na przykład fosforylacja czy acetylacja. Nukleazą, której aktywność może być regulowana przez post-translacyjną modyfikację, jest DNaza γ . Białko to jest substratem dla polimerazy poli-ADP rybozy (PARP), a poli-ADP rybozylacja hamuje jego aktywność [50]. PARP jest substratem dla kaspazy-3, a jego proteolizę i inaktywację obserwuje się w trakcie apoptozy [45].

VI. KONDENSACJA CHROMATYNY W KOMÓRKACH ULEGAJĄCYCH APOPTOZIE

Jedną ze zmian morfologicznych typowych dla komórek ulegających apoptozie jest kondensacja chromatyny (rys. 1C). Mechanizmy apoptotycznej kondensacji chromatyny i kondensacji chromatyny w trakcie podziałów komórki są inne. Swoistą cechą mitotycznej kondensacji chromosomów jest fosforylacja histonów H1 i H3,

przebiega ona bez fragmentacji chromatyny. Kondensacja w czasie apoptozy polega prawdopodobnie na agregacji heterochromatyny poprzedzonej degradacją euchromatyny, szkieletu jądrowego i szkieletu cytoplazmatycznego [15]. Apoptotyczna kondensacja chromatyny towarzyszy zwykle fragmentacji DNA. Początkowo sądzono, że fragmentacja DNA jest jedynym i wystarczającym czynnikiem indukującym kondensację chromatyny. Hipotezę taką potwierdzały doświadczenia, w których obserwowano kondensację chromatyny w komórkach poddanych działaniu nukleazy mikrokokalnej [1]. W chwili obecnej znane są trzy niezależne mechanizmy indukujące kondensację chromatyny w komórkach apoptotycznych. Jeden z tych mechanizmów wymaga degradacji DNA do fragmentów oligonukleosomowych i zależy od nukleazy DFF40/CAD [27]. Inny mechanizm kondensacji chromatyny zależy od białka AIF (ang. *apoptosis-inducing factor*). AIF jest białkiem mitochondrialnym o masie 57 kDa, przemieszczającym się do jąder po zainicjowaniu apoptozy (jego wypływ z mitochondriów blokowany jest przez białko Bcl-2). Po pojawieniu się w jądrach, AIF indukuje degradację DNA do fragmentów o długości 50 kb oraz kondensację chromatyny. Mechanizm nie wymaga działania kaspaz, nie obserwuje się również degradacji chromatyny do fragmentów oligonukleosomowych [43]. Kolejny znany czynnik białkowy, *Acinus*, indukuje kondensację chromatyny przy braku obserwowanej degradacji DNA. *Acinus* syntetyzowany jest w formie dłuższych białek prekursorowych (*AcinusL*, *AcinusS* i *AcinusS'*, o masach 220, 98 i 94 kDa), zawierających miejsce rozpoznawane przez kaspazę-3. Aktywacja białka wymaga proteolizy przez kaspazę-3, a czynnikiem inicjującym kondensację chromatyny jest generowany fragment o masie 17 kDa [37]. Prawdopodobnie w czasie normalnego przebiegu apoptozy wszystkie trzy mechanizmy partycypują w indukcji kondensacji chromatyny. Na dalszych etapach apoptozy fragmenty skondensowanej chromatyny (wraz z fragmentami cytoplazmy) upakowywane są w postaci ciałek apoptotycznych. Proces ten wymaga katalizowanej przez kaspazę-6 degradacji lamin [25].

VII. PODSUMOWANIE I KONKLUZJE

Aktywnie inicjowana i kontrolowana degradacja makrocząsteczek komórkowych jest istotą programowanej śmierci komórki, apoptozy. Degradacja DNA w trakcie apoptozy przebiega w dwu etapach. Po zainicjowaniu apoptozy z chromosomów wycinane są fragmenty o długości ok. 50 kb (lub ich oligomery), odzwierciedlające pętlową domenową strukturę chromatyny. W następnej kolejności DNA degradowany jest do fragmentów mono- i oligonukleosomowych. Niektóre typy komórek umierają w wyniku czynników indukujących apoptozę bez tego drugiego, bardziej intensywnego etapu fragmentacji DNA.

Degradacja DNA przyspiesza fragmentację jądra komórkowego i powstawanie ciałek apoptotycznych. Jest również procesem minimalizującym ryzyko przekazania

innym komórkom uszkodzonego lub zmienionego materiału genetycznego. Degradacja DNA w trakcie apoptozy mogłaby więc być funkcjonalnym odpowiednikiem zjawiska restrykcji obserwowanego w komórkach bakteryjnych. Organizmy eukariotyczne, nie mając praktycznej możliwości rozpoznania i eliminacji z komórki „obcego” DNA, mogłyby eliminować całą komórkę zawierającą „obcy” czy nieprawidłowy DNA. Fragmentacja DNA nukleosomowego jest rezultatem procesu apoptozy i ma miejsce w późnych etapach jego przebiegu. Można jednak spekulować, czy powstawanie fragmentów HMW jest tylko efektem, czy może również przyczyną apoptozy. Wiadomo, że pęknięcia DNA inicjują mechanizmy blokady cyklu komórkowego, a obecność jednego lub kilku dwuniciowych pęknięć DNA jest sygnałem wystarczającym do zainicjowania procesów, które w efekcie prowadzą do zablokowania podziałów komórki [48]. Podobne lub te same białka (m.in. p53, ATM, DNA-PK) zaangażowane są w przekazywanie sygnałów wiodących do inicjacji apoptozy lub blokady cyklu komórkowego [5]. Można więc przypuszczać, że pęknięcia DNA i powstawanie fragmentów HMW jest czynnikiem inicjującym lub choćby współinicjującym proces apoptozy. Na korzyść takiej hipotezy przemawia fakt, że wśród czynników inicjujących apoptozę znajdują się takie, które pośrednio (np. inhibitory topoizomerazy II DNA) lub bezpośrednio (promieniowanie jonizujące) indukują dwuniciowe pęknięcia DNA.

Chociaż degradacja chromatyny do fragmentów oligonukleosomowych nie jest całkowicie niezbędna dla śmierci komórki, to przez swoją uniwersalność jest powszechnie wykorzystywana jako molekularny znacznik procesu apoptozy. Detekcja fragmentacji DNA w rozdziale elektroforetycznym (na żelach agarozowych lub poliakrylamidowych) DNA genomowego jest jedną z biochemicznych technik wykrywania komórek ulegających apoptozie. Podwójno-niciowe pęknięcia DNA zawierające końce 3'-OH są substratami dla terminalnej transferazy. Cecha ta jest wykorzystywana w jednym z najpopularniejszych testów na wykrywanie komórek apoptotycznych, tzw. *TUNEL Assay*. Cechą morfologiczną powszechnie wykorzystywaną dla detekcji komórek ulegających apoptozie (związaną z fragmentacją DNA) jest kondensacja chromatyny. Najprostszy sposób jej wykrycia to obserwacja mikroskopowa komórek wybarwionych diamidino-2-fenylindolem (DAPI), barwnikiem fluorescencyjnym wiążącym się z DNA.

Enzymem odpowiedzialnym za apoptotyczną fragmentację DNA w większości typów komórek jest endonukleaza DFF40/CAD. Białko to obecne jest w jądrze komórkowym w postaci nieaktywnego kompleksu z inhibitorem, a jego aktywacja zależna jest od kaspazy-3 usuwającej inhibitor. Prawdopodobnie w proces fragmentacji DNA zaangażowane są również inne nukleazy, z których część przedostaje się do jąder komórkowych w wyniku zmian strukturalnych mających miejsce w trakcie apoptozy. Czynnikiem ułatwiającym fragmentację DNA jest proteoliza białek chromatyny, katalizowana przez kaspazy i inne nukleazy aktywowane w trakcie

apoptozy. Z degradacją DNA i białek jądrowych związana jest kondensacja chromatyny, cecha morfologiczna typowa dla komórek ulegających apoptozie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARENDS MJ, MORRIS RG, WYLLIE AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; **136**: 593–608.
- [2] BARTOSZ G. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Biochem* 1998; **44**: 22–31.
- [3] BODNAR JW, BRADLEY MK. A chromatin switch. *J Theor Biol* 1996; **183**: 1–7.
- [4] BUDIHARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, LUO X, WANG X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; **15**: 269–290.
- [5] CARR AM. Piecing together the p53 puzzle. *Science* 2000; **287**: 1765–1766.
- [6] COTE J, RUIZ-CARRILLO A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 1993; **261**: 765–769.
- [7] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**: 43–50.
- [8] FAMULSKI KS, MACDONALD D, PATERSON MC, SIKORA E. Activation of a low pH-dependent nuclease by apoptotic agents. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 281–289.
- [9] FRASER MJ, TYNAN SJ, PAPAIOANNOU A, IRELAND CM, PITTMAN SM. Endo-exonuclease of human leukaemic cells: evidence for a role in apoptosis. *J Cell Sci* 1996; **109**: 2343–2360.
- [10] GRADZKA I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 1999; **46**: 2–16.
- [11] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–21.
- [12] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek. *Post Biochem* 1999; **45**: 167–176.
- [13] GU J, DONG RP, ZHANG C, MCLAUGHLIN DF, WU MX, SCHLOSSMAN SF. Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. *J Biol Chem* 1999; **274**: 20759–20762.
- [14] HALENBECK R, MACDONALD H, ROULSTON A, CHEN TT, CONROY L, WILLIAMS LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* 1998; **8**: 537–540.
- [15] HENDZEL MJ, NISHIOKA WK, RAYMOND Y, ALLIS CD, BAZETT-JONES DP, TH'NG JPH. Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24470–24478.
- [16] HUANG P, BALLAL K, PLUNKETT W. Biochemical characterization of the protein activity responsible for high molecular weight DNA fragmentation during drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 1997; **57**: 3407–3414.
- [17] HUGHES FM, BORTNER CD, PURDY GD, CIDLOWSKI JA. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30567–30576.
- [18] INOHARA N, KOSEKI T, CHEN S, BENEDICT MA, NUNEZ G. Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem* 1999; **274**: 270–274.
- [19] INOHARA N, KOSEKI T, CHEN S, WU X, NUNEZ G. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* 1998; **17**: 2526–2533.

- [20] JANIĄK MK, WREMBEL-WARGOCKA J, CHEDA A. Apoptoza popromienna – mechanizmy, rola biologiczna i możliwości wykorzystania w terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 1998; **26**: 267–283.
- [21] KOKILEVA L. Multi-step chromatin degradation in apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; **105**: 339–343.
- [22] KHODAREV NN, SOKOLOVA IA, VAUGHAN ATM. Mechanisms of induction of apoptotic DNA fragmentation. *Int J Radiat Biol* 1998; **73**: 455–467.
- [23] KRIESER RJ, EASTMAN A. The cloning and expression of human deoxyribonuclease II, a possible role in apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 30909–30914.
- [24] LAGARKOVA MA, IAROVAIA OV, RAZIN SV. Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20239–20241.
- [25] LAZEBNIK YA, TAKAHASHI A, MOIR RD, GOLDMAN RD, POIRIER GG, KAUFMANN SH, EARNSHOW WC. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9042–9046.
- [26] LI TK, CHEN AY, YU C, MAO Y, WANG H, LIU LF. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. *Genes Dev* 1999; **13**: 1553–1560.
- [27] LIU X, LI P, WIDLAK P, ZOU H, LUO X, GARRARD WT, WANG X. DFF40 induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8461–8466.
- [28] LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; **89**: 175–184.
- [29] LIU X, ZOU H, WIDLAK P, GARRARD WT, WANG X. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interactions with histone H1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 13836–13840.
- [30] MONTAGUE JW, CIDŁOWSKI JA. Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. *Experientia* 1996; **52**: 957–962.
- [31] MONTAGUE JW, HUGHES FM, CIDŁOWSKI JA. Native recombinant cyclophilins A, B and C degrade DNA independently of peptidylpropyl cis-trans-isomerase activity. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6677–6684.
- [32] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 315–334.
- [33] MUKAE N, ENARI M, SAKAHIRA H, FUKUDA Y, INAZAWA J, TOH H, NAGATA S. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9123–9128.
- [34] OBERHAMMER F, WILSON JW, DIVE C, MORRIS ID, HICKMAN JA, WAKELING AE, WALKER PR, SIKORSKA M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993; **12**: 3679–3684.
- [35] PEITSCH MC, POLZAR B, STEPHAN H, CROMPTON T, MACDONALD HR, MANNHERZ HG, TSCHOPP J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 1993; **12**: 371–377.
- [36] ROŻYŃKOWA D, FILIP A. Endogenne białka przeciwdziałające apoptozie. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 561–578.
- [37] SAHARA S, AOTO M, EGUCHI Y, IMAMOTO N, YONEDA Y, TSUJIMOTO Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 1999; **401**: 168–173.

- [38] SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L and ICAD-S. *J Biol Chem* 1999; **274**: 15740–15744.
- [39] SHIOKAWA D, TANUMA S. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease DNase γ . *Biochem J* 1998; **332**: 713–720.
- [40] SHRODE LD, TAPPÉR H, GRINSTEIN S. Role of intracellular pH in proliferation, transformation and apoptosis. *J Bioenerg Biomembranes* 1997; **29**: 393–399.
- [41] SIKORA E. Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki. *Post Biochem* 1996; **42**: 108–113.
- [42] SKALKA M, MATYASOVA J, CEJKOVA M. DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissue degrades *in vivo* into regular fragments. *FEBS Lett* 1976; **72**: 271–275.
- [43] SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZANI N, MARZO I, SNOW BE, BROTHERS GM, MANGION J, JACOTOT E, CONSTANTINI P, LOEFFLER M, LAROCHETTE N, GOODLETT DR, AEBERSOLD R, SIDEROVSKI DP, PENNINGER JM, KROEMER G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**: 441–446.
- [44] TORRIGLIA A, PERANI P, BROSSAS JY, CHAUDUN E, TRETON J, COURTOIS Y, COUNIS M-F. L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3612–3619.
- [45] VILLA P, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 388–392.
- [46] WIDŁAK P, LI P, WANG X, GARRARD WT. Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem* 2000; **275**: 8226–8232.
- [47] WIDŁAK P. Apoptoza: nukleaza, kaspazy, cytochrom c. *Post Biochem* 1998; **44**: 252–254.
- [48] WIDŁAK P. Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego. *Post Biochem* 1997; **43**: 85–90.
- [49] WYLLIE AH. An endonuclease at last. *Nature* 1998; **391**: 20–21.
- [50] YAKOVLEV AG, WANG G, STOICA BA, SIMBULAN-ROSENTHAL CM, YOSHIHARA K, SMULSON ME. Role of DNAS1L3 in Ca- and Mg-dependent cleavage of DNA into oligonucleosomal and high molecular mass fragments. *Nucl Acids Res* 1999; **27**: 1999–2005.
- [51] ZHANG J, LIU X, SCHERER DC, VAN KAER L, WANG X, XU M. Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12480–12485.
- [52] ZHANG J, WANG X, BOVE KE, XU M. DNA fragmentation factor 45-deficient cells are more resistant to apoptosis and exhibit different dying morphology than wild-type control cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37450–37454.
- [53] ZHIVOTOVSKY B, WADE D, NICOTERA P, ORRENIUS S. Role of nucleases in apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; **105**: 333–338.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 07.07.2000 r.

Przyjęto: 19.07.2000 r.

Adres autora: Wybrzeże AK15, 44-100 Gliwice

E-mail: widlak@onkol.instonko.gliwice.pl

MIEJSCE I ROLA MOLEKUŁY CD56/NCAM W BIOLOGII I MEDYCYNIE*

PLACE AND ROLE OF CD56/NCAM MOLECULE IN BIOLOGY AND MEDICINE

Jan ŻEROMSKI

Katedra i Zakład Immunologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Streszczenie. W pracy przedstawiono aktualny stan badań nad izoformą 140 kD nerwowej cząsteczki adhezyjnej CD56/NCAM. Omówiono krótko biosyntezę, budowę, a także przypuszczalne funkcje cząsteczki. Zróżnicowanie budowy cząsteczki wynika nie tylko ze zmian potranskrypcyjnych mRNA, ale także z modyfikacji w okresie potranslacyjnym, polegających na przyłączaniu różnych grup chemicznych. Wskazano na główne miejsca jej występowania zarówno w tkankach prawidłowych, jak w patologii ludzkiej, głównie w nowotworach złośliwych. W odniesieniu do tkanek prawidłowych oprócz układu nerwowego ważnymi miejscami występowania CD56 okazują się gruczoły dokrewne. Wśród nowotworów złośliwych oprócz guzów pochodzenia neuroektodermalnego CD56 występuje na komórkach licznych nowotworów układu krwiotwórczego, mięsaków z mięśni poprzecznie prążkowanych, a także niektórych raków. Zwrócono także uwagę na możliwości wykorzystania oznaczeń CD56 w medycynie klinicznej.

(Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 599–608)

Słowa kluczowe: cząsteczki adhezyjne, CD56/NCAM, komórki NK, układ nerwowy, gruczoły dokrewne, interakcje homofilne, nowotwory złośliwe, przydatność kliniczna.

Summary. The actual state of study on 140 kD isoform of neural cell adhesion molecule (CD56/NCAM) was presented. Its biosynthesis, structure and putative functions were shortly delineated. Complexity of CD56 structure is the result not only of posttranscriptional alterations of mRNA, but also posttranslational modifications due to binding of various chemical groups. Its distribution both in normal and pathological tissues was described, the latter predominantly within malignant tumors. In normal tissues apart from nervous system an important localization of CD56 appears to be on cells of endocrine glands. Among malignant tumors apart from neoplasms of neuroectodermal origin, CD56 is expressed on cells of several tumors of hemopoietic system, rhabdomyosarcomas but also on some carcinomas. The attention was paid

*Praca została dofinansowana z grantu badań własnych A.M. w Poznaniu, nr projektu: 501-1-18-02.

to the possible value of the determination of CD56 in clinical medicine.
(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 599–608)

Key words: adhesion cells, CD56/NCAM, neural system, malignant tumors

WSTĘP

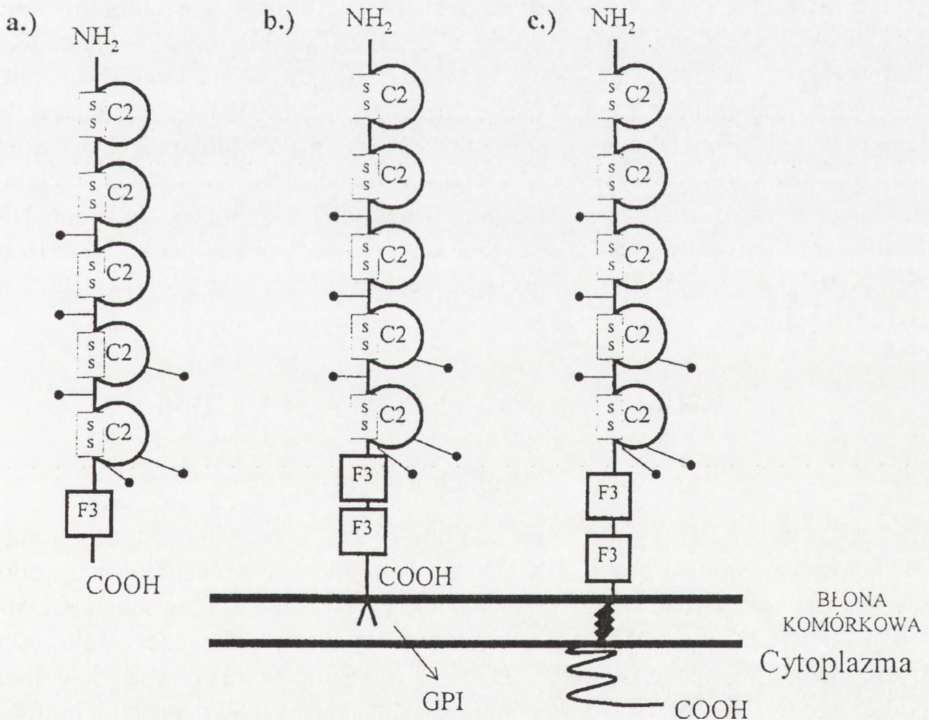
Nerwowa cząsteczka adhezyjna (*neural cell adhesion molecule* – NCAM), znana również jako antygen NKH-1, a także jako antygen Leu-19, należy do najlepiej scharakteryzowanych molekuł adhezyjnych, zarówno u zwierząt jak i u człowieka. Znane są molekularne etapy jej syntezy i modyfikacji potranskrypcyjnych. Niejasne wciąż pozostaje jej znaczenie i funkcje biologiczne, choć przyjmuje się za udowodnioną jej rolę w morfogenezie układu nerwowego. NCAM występuje w co najmniej 3 izoformach, będących wynikiem potranskrypcyjnego składania (*splicing*) mRNA. Jedna z tych izoform, CD56/NCAM budzi od lat wielkie zainteresowanie badaczy, a także praktyków biologii i medycyny ze względu na jej szerokie występowanie w różnych tkankach i narządach oraz rosnące znaczenie diagnostyczne, jak też prognostyczne w wielu jednostkach chorobowych. Nowe metody, takie jak: konstrukcja sondy – cDNA dla CD56, możliwości oceny ekspresji na komórkach, jak i formy złuszczonej w płynach ustrojowych, poszerzyły warsztat badawczy i pozwoliły na bliższe określenie jej miejsca wśród innych molekuł adhezyjnych. W dalszym ciągu jednak cząsteczka CD56 pozostaje wyzwaniem dla szeroko pojętego kręgu ludzi teorii i praktyki.

BIOSYNTENZA CD56/NCAM

MRNA dla NCAM kodowany jest przez pojedynczy gen zlokalizowany na chromosomie 11 (11q23-q24) u człowieka i na chromosomie 9 u myszy. Region kodujący w genie kurczenia stanowi co najmniej 19 eksonów, obejmujących około 50 kb. Ponadto gen zawiera 5 eksonów nie kodujących w pobliżu 5' eksonu 1, co powiększa wielkość genu do 70 kb. Znane są co najmniej 4 mRNA dla NCAM kodujące poszczególne polipeptydy tworzące cząsteczkę białka. Potranskrypcyjne modyfikacje mRNA warunkują powstanie co najmniej 3 izoform o masie cząsteczkowej 120, 140 i 180 kDa [19]. Dalsze modyfikacje mogą występować w okresie potranslacyjnym i obejmować takie procesy, jak: glikozylacja, acylacja kwasów tłuszczowych, fosforylacja i inne. Faktycznie istnieje ponad 20 różnych izoform NCAM, w tym także molekula rozpuszczalna, uwalniana z powierzchni komórki [1, 8]. Produkt finalny biosyntezy NCAM ma 689 reszt aminokwasowych i pokryty jest kwasem α -2,8-polisialowym (PSA). Dokładne etapy biosyntezy NCAM i jej regulacja nie są bliżej znane. Jest to cząsteczka stara filogenetycznie i o uniwersalnym występowaniu. Homologi NCAM, tzw. fasykliny, wykryto już u owadów [2].

BUDOWA CZĄSTECZKI CD56

CD 56/NCAM należy do wielkiej nadrodziny immunoglobulin (Ig), co manifestuje się w budowie cząsteczki. NCAM jest pojedynczą giętką strukturą białkową mającą część zewnątrzkomórkową, przezbłonową i cytoplazmatyczną (rys. 1). Część zewnętrzna ma 5 domen C2 Ig podobnych oraz 2 domeny fibronektyno-podobne w pobliżu błony komórkowej. Część przezbłonowa albo przenika bezpośrednio przez błonę komórkową, albo jest zakotwiczona w otoczcze glikozylo-fosfatydyloinozytolu (GPI). Część cytoplazmatyczna jest stosunkowo krótka i kończy się resztą COOH. Część zewnątrzkomórkowa ma co najmniej 6 potencjalnych miejsc nadających się do N-zależnej glikozylacji potranslacyjnej. Możliwe są też inne modyfikacje cząsteczki, takie jak: fosforylacja seryny i treoniny w części cytoplazmatycznej, acylacja i sulfacja oligosacharydów związanych z asparaginą i inne [4, 8, 44]. W mikroskopie elektronowym izolowane cząsteczki NCAM, długości od 30 do 60 nm, w 30% występują jako pojedyncze „witki”, w 50% jako dublety, a pozostałe tworzą agregaty



RYSUNEK 1. Budowa różnych form części zewnątrzkomórkowej cząsteczki NCAM: a – forma wolna (rozpuszczalna), b – forma zakotwiczona w błonie komórkowej przez GPI, c – forma przezbłonowa (jak CD56), C2 – domeny z nadrodziny immunoglobulin, F3 – domeny homologiczne z fibronektyną typu 3 (według [1, 3] zmodyfikowane)

TABELA I. Najczęściej stosowane przeciwciała monoklonalne przeciw CD56/NCAM

Symbol (klon)	Gatunek	Izotyp	Źródło
Leu-19	Mysie	IgG1	LL Lanier i wsp. [28]
NKH1	Mysie	IgM	T Hercend i wsp. [20] Ritz i wsp. [46]
T-199	Mysie	IgG1	HJ Feickert i wsp. [14]
N901	Mysie	IgG1	JD Griffin i wsp. [16]
MOC-1	Mysie	IgG1	L DeLeij i wsp. [9]
ERIC-1	Mysie	IgG1	SP Bourne i wsp. [5]
L185	Mysie	IgM	LL Lanier i wsp. [30]
123C3	Mysie	Brak danych	DJ Schol i wsp. [51]

przypominające wiatraczek (*pinwheel*) [4, 18]. Znamioną cechą cząsteczki, wiążącą się ze stadium rozwojowym ustroju jest obecność na niej otoczki wielocukru α -2,8 -kwasu polisialowego (PSA). Połączenie PSA z cząsteczką NCAM ma miejsce przez reszty asparaginowe oligocukrów. Obecność PSA nadaje cząsteczce ładunek ujemny. Ładunek ten jest największy na komórkach zarodkowych i stopniowo zmniejsza się w miarę dojrzewania ustroju i w zależności od rodzaju tkanki [8, 48]. Udowodniono że antygen CD56 (NKH1) znajdujący się na komórkach NK jest identyczny z izoformą NCAM o masie cząsteczkowej 140 kD występującą w tkance nerwowej [31]. Przy pomocy wiązań krzyżowych i reakcji blokowania w cytometrii przepływowej przez wytworzone w różnych ośrodkach (tab. 1) przeciwciała monoklonalne (mAb) wykazano istnienie co najmniej 3 epitopów antygeny NKH1: NKH1a zdefiniowany przez mAb N3 (Leu-19) i N21 (FP2-11.14), NKH1b przez N9 (N901) i N77 (NKH1A) i NKH1c określony przez mAb N63 (T-199) i N126 (L185) [52].

MIEJSCA WYSTĘPOWANIA CD56

Tkanki normalne

Cząsteczka CD56 występuje na komórkach NK i uważana jest za ich antygen różnicowania. Stopień ekspresji CD56 na komórkach NK oceniany przy pomocy cytometrii przepływowej pozwolił na ich podział na komórki o wysokiej ($CD56^{high}$) i o niskiej ($CD56^{low}$) ekspresji. Te ostatnie są w zdecydowanej większości we krwi obwodowej [15]. Odsetek $CD56^{high}$ wykazuje wyraźny spadek u ludzi w podeszłym wieku [25]. CD56 występuje jednak także na małym odsetku limfocytów T, CD4+ i CD8+. Limfocyty T hodowane *in vitro* w obecności czynników stymulujących nabywają ekspresję CD56, co wiąże się z ich przekształceniem w komórki LAK (*lymphokine activated killers*) [47].

CD56 występuje obficie w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, na neuronach różnych części mózgowia, komórkach glejowych, pniach nerwów, a także na złączach nerwowo-mięśniowych. Stwierdzono jego obecność także na włóknach mięśniowych zwłaszcza odnerwionych i regenerujących, a także na mięśniowych komórkach satelitarnych [13, 22]. CD56 wykryto także w strukturach i gruczołach wydzielania wewnętrznego, a zwłaszcza neuroendokrynowych. Izoformę 140 kD NCAM wykazano na komórkach części gruczołowej przysadki mózgowej, części rdzennej nadnercza, komórkach endokrynowych jajnika i komórkach wysp Langerhansa szczura [27, 36]. W materiale ludzkim CD56 występuje na komórkach nabłonka gruczołowego tarczycy [35, 55, 57], a także na komórkach C tarczycy, części rdzennej nadnerczy [23], na komórkach części gruczołowej ludzkich nadnerczy i przysadki mózgowej [60]. Natomiast w przytarczycach wykryto mRNA dla NCAM, ale nie udało się wykazać odpowiedniego białka na komórkach [23].

Tkanki patologiczne

CD56 występuje na powierzchni wielu komórek nowotworowych, zwłaszcza nowotworów, ale nie tylko, wywodzących się z układu krwiotwórczego. Jest obecny na komórkach wielu białaczek i chłoniaków nieziarniczych, wywodzących się z komórek NK, limfocytów T, a także komórek linii mieloidalnej [21, 33]. Często występuje na komórkach szpiczaka mnogiego, czerniaka, mięsaka Ewinga, a także mięsaka z mięśni poprzecznie prążkowanych (*rhabdomyosarcoma*) [12, 14, 37, 42]. Jest niemal zawsze obecny w guzach pochodzenia nerwowego, takich jak: neuroblastoma, medulloblastoma czy astrocytoma [14, 50]. Występuje jednak także na komórkach niektórych raków, zwłaszcza raka drobnokomórkowego płuca, a także raka sutka [6, 41, 51]. Wykrywalność CD56 w utkanie nowotworów znacznie wzrosła po wytworzeniu przeciwciał monoklonalnych reagujących ze skrawkami utraconymi rutynowo i zatopionymi w parafinie jak np. mAb 123C3 [24, 51].

FUNKCJE BIOLOGICZNE CD56

Zgodnie z nazwą (NCAM) jest to komórkowa cząsteczka adhezyjna, ale dokładne dane odnośnie funkcji CD56, zwłaszcza w różnych lokalizacjach, pozostają nieznane. Jej ekspresja na błonie komórkowej umożliwia interakcje z innymi komórkami. Uważa się, że jest to homofilna cząsteczka adhezyjna, co oznacza, że oddziaływania międzykomórkowe mogą mieć miejsce, jeżeli obie komórki mają ją na swej powierzchni [8]. Okazało się jednak, że możliwe są także interakcje heterofilne CD56 (p. dalej). Panuje powszechne przekonanie, że interakcje mediowane przez CD56/NCAM są niezależne od jonów wapnia. Jednak przeciwciała anty NCAM blokują agregację komórek Ca^{++} -zależną [49]. Uważa się powszechnie, że rola NCAM jest istotna w morfogenezie układu nerwowego. Przeciwciała przeciwko

NCAM hamują normalny wzrost i przebieg pączkującego nerwu [54]. Rola CD56 w rozwoju układu nerwowego jest jednak kwestionowana, ponieważ kontrola wzrostu i kierunku aksonów wymaga precyzyjnych i ściśle określonych etapów ekspresji [54]. Ponadto wykazano, że proliferacja komórek wykazujących ekspresję NCAM ulega zahamowaniu po dodaniu wolnej NCAM [26]. Właściwości adhezyjne cząsteczki NCAM wydają się być hamowane przez otoczkę PSA, ponieważ usunięcie PSA wzmacnia zdolność NCAM do adhezji. Z drugiej strony usunięcie PSA z cząsteczki CD56 drastycznie redukuje jej zdolność stymulacji wzrostu aksonów [10]. Istnieją przypuszczenia, że NCAM warunkuje interakcje synaptyczne związane z takimi czynnościami mózgowia, jak uczenie się i pamięć [11].

W odniesieniu do innego występowania CD56/NCAM niż w układzie nerwowym nasza wiedza odnośnie funkcji tej molekuly jest jeszcze bardziej skąpa. Początkowo uważano, że CD56 na komórkach NK ma istotne znaczenie w ich interakcjach z komórkami docelowymi i naturalnej cytotoksyczności [38]. Nie potwierdzili tego inni autorzy [28]. Ostatnio jednak wykazano, że ekspresja CD56 na limfocytach T CD8+ wykazuje ścisłą współzależność z ich funkcją cytolityczną [40, 43].

Podważono również homofilność interakcji CD56. Wykazano bowiem, że hodowane ludzkie tymocyty pozbawione klasycznych cząsteczek adhezyjnych, takich jak: CD2 czy CD11a/CD18, zdolne są do adhezji do komórek śródbłonna z żyły pępowinowej. Adhezja ta była zależna od CD56, pomimo braku tej molekuly na komórkach śródbłonkowych [45], co przemawia za heterofilnym oddziaływaniem obu rodzajów komórek. Następną ważną reakcją heterofilną było stwierdzenie udziału CD56, obok innych molekuł adhezyjnych, w adhezji ustalonych linii komórek nowotworowych do komórek śródbłonna. Jest to proces niezależny od obecności jonów Ca^{++} ani od obecności PSA na komórce [56]. Może to mieć istotne znaczenie w wyjaśnieniu miejscowej progresji nowotworu. Ligandem dla NCAM na komórkach śródbłonna może być siarczan heparanu, gdyż istnieją doniesienia o wiązaniu tego związku przez NCAM [7].

W odniesieniu do ekspresji CD56 na komórkach nabłonkowych tarczycy zwracała uwagę zależność między wysoką ekspresją a stanem nadczynności gruczołu i *vice versa* [58, 59]. Można jedynie domniemywać, że cząsteczka ta w jakiś sposób uczestniczy w produkcji i/lub sekrecji hormonu. Są to tylko przypuszczenia, wymagające dalszych badań. Warto tu jednak dodać, że istnieją dane wskazujące na rolę regulacyjną hormonów tarczycy na ekspresję NCAM, stwierdzoną jak dotąd u płazów i gryzoni [34, 53].

UŻYTECZNOŚĆ OZNACZEŃ CD56 W MEDYCYNIE

Oznaczanie ekspresji CD56 na komórkach nowotworowych przy pomocy cytometrii przepływowej okazało się użyteczne zarówno w diagnostyce, jak i w klasyfikacji wielu nowotworów układu krwiotwórczego, takich jak: białaczki/chłoniaki

z komórek NK i komórek T [21], szpiczak mnogi, niektóre białaczki z linii mieloidalnej [12, 33, 48] i inne.

W białaczkach/chłoniakach z komórek NK (LGL) oznaczanie CD56 ma znaczenie diagnostyczne i prognostyczne. W nowotworach z komórek T stwierdzenie ekspresji tej molekuly na komórkach guza znacznie pogarsza rokowanie. Natomiast nie stwierdzono tej zależności na dużym materiale w odniesieniu do niedrobnokomórkowego raka płuca [17].

Wykazano natomiast, że w raku płuca o wysokiej złośliwości (*high grade*) występuje głównie NCAM związana z kwasem polisialowym (NCAM-PSA), co ma świadczyć o niskim stopniu zróżnicowania nowotworu i niekorzystnym przebiegu klinicznym [32]. W szpiczaku mnogim (*myeloma multiplex*) obecność CD56 jest zmienna dla rozpoznania. Ponadto stwierdzenie wysokiego stężenia postaci wolnej w surowicy krwi pozwala odróżnić szpiczaka od innych paraproteinemii [39].

Ze względu na sekwencyjne pojawianie się izoform NCAM na komórkach w rozwoju, w tym także nowotworowych, niektórzy autorzy jak np. Zocchi [56] uważają, że należy tę cząsteczkę traktować jako antygen płodowo-nowotworowy lub jako marker wzrostu i różnicowania guza.

Ponadto, oznaczanie CD56 jako markera komórek NK na komórkach krwi obwodowej może być użyteczne w diagnostyce niedoborów immunologicznych, zarówno pierwotnych jak i wtórnych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALBERS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. *Molecular Biology of the Cell*. London, New York, Garland Publ 1994, 950–970.
- [2] BALDWIN TJ, FAZELI MS, DOHERTY P, WALSH F. Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J Cell Biochem* 1996; **61**: 502–513.
- [3] BARCLAY AN, BIRKELAND ML, BROWN MH, BEYERS AD, DAVIS SJ, SOMOZA CH, WILLIAMS AF. The Leucocyte Antigen. Facts Book. London Academic Press, 1993: 228.
- [4] BECKER JW, ERICKSON HP, HOFFMAN S, CUNNINGHAM BA, EDELMAN GM. Topology of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1088–1092.
- [5] BOURNE SP, PATEL K, WALSH F, POPHAM CJ, COAKHAM HB, KEMSHEAD JT. A monoclonal antibody (ERIC-1) raised against retinoblastoma, that recognizes the neural cell adhesion molecule (NCAM) expressed on brain and tumors arising from the neuroderm. *J Neurooncol* 1991; **10**: 111–119.
- [6] CARBONE DP, KOROS AMC, LINNOILA RI, JEWETT P, GAZDAR AF. Neural cell adhesion molecule expression and messenger RNA splicing patterns in lung cancer cell lines are correlated with neuroendocrine phenotype and growth morphology. *Cancer Res* 1991; **51**: 6142–6149.
- [7] COLE GJ, BURG M. Characterization of heparan sulfate proteoglycan that copurifies with the neural cell adhesion molecule. *Exp Cell Res* 1989; **182**: 44–60.
- [8] CUNNINGHAM BA, HEMPERLY JJ, MURRAY BA, PREDIGER EA, BRACKENBURY R, EDELMAN GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987; **236**: 799–806.

- [9] DELEJ L, POPPEMA S, NULEND JK. Neuroendocrine differentiation antigen on human lung carcinoma and Kulchitski cells. *Cancer Res* 1985; **45**: 2192–2200.
- [10] DOHERTY P, COHEN J, WALSH FS. Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 1990; **5**: 209–219.
- [11] DOHERTY P, FAZELI MS, WALSH FS. The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J Neurobiol* 1995; **26**: 437–446.
- [12] DRACH J, GATTRINGER C, HUBER H. Expression of the neural cell adhesion molecule (CD56) by human myeloma cells. *Clin Exp Immunol* 1991; **83**: 418–422.
- [13] EDELMAN GM, CROSSIN KL. Cell adhesion molecules. Implications for molecular histology. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**: 155–190.
- [14] FEICKERT HJ, PIETSCH T, HADAM MR, RIEHM H. NK-cell marker: mAb T-199 detects a new antigenic determinant distinct from N 901, Leu-19, and Leu-7 antigens or antigen epitopes expressed on NK cells. [w] Knapp W. [red.] Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press 1989: 705–708.
- [15] FREY M, PACKIANATHAN NB, FEHNIGER TA, ROSS ME, WANG WCH, STEWART CC, CALIGIURI MA, EVANS SS. Differential expression and function of L-selectin on CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998; **161**: 400–408.
- [16] GRIFFIN JD, HERCEND T, BEVERIDGE R, SCHLOSSMAN SF. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. *J Immunol* 1983; **130**: 2947–2951.
- [17] HAGE R, ELBERS HR, BRUTEL DE LA RIVIERE A, VAN DEN BOSCH JM. Neural cell adhesion molecule expression: prognosis in 889 patients with resected non-small cell lung cancer. *Chest* 1998; **114**: 1316–1320.
- [18] HALL AK, RUTISHAUSER U. Visualization of neural cell adhesion molecule by electron microscopy. *J Cell Biol* 1987; **104**: 1579–1586.
- [19] HEMPERLY JJ, DEGUGLIELMO JK, REID RA. Characterization of cDNA clones defining variant forms of human neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Mol Neurosci* 1990; **2**: 71–78.
- [20] HERCEND T, GRIFFIN JD, BENSUSSAN A, SCHMIDT RE, EDSON MA, BRENNAN A, MURRAY C, DALEY JF, SCHLOSSMAN SF, RITZ J. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest* 1985; **75**: 923–943.
- [21] INTERNATIONAL LYMPHOMA STUDY GROUP. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; **84**: 1361–1392.
- [22] ILLA I, LEON-MONZON M, DALAKAS MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by natural killer cells. *Ann Neurol* 1992; **31**: 46–52.
- [23] JIN L, HEMPERLY JJ, LLOYD RV. Expression of neural cell adhesion molecule in normal and neoplastic human neuroendocrine tissues. *Amer J Path* 1991; **138**: 961–969.
- [24] KAUFMANN O, GEORGI T, DIETEL M. Utility of 123 C3 monoclonal antibody against CD56 (NCAM) for the diagnosis of small cell carcinoma on paraffin sections. *Hum Pathol* 1997; **28**: 1373–1378.
- [25] KRISHNARAJ R. Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. *Mech Ageing Developm* 1997; **96**: 89–101.
- [26] KRUSHEL LA, TAI MH, CUNNINGHAM BA, EDELMAN GM, CROSSIN KL. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2592–2596.
- [27] LANGLEY OK., ALETSEE-UFRECHT MC, GRANT NJ, GRANTZL M. Expression of the neural cell adhesion molecule NCAM in endocrine cells. *J Histochem Cytochem* 1989; **37**: 781–791.

- [28] LANIER LL, CHANG CH, AZUMA M, RUITENBERG JJ, HEMPERLY JJ, PHILLIPS JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 1991; **146**: 4421–4426.
- [29] LANIER LL, LE AM, CIVIN CI, LOKEN MR, PHILLIPS JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; **136**: 4480–4490.
- [30] LANIER LL, LE AM, DING A, EVANS EL, KRENSKY AM, CLAYBERGER C, PHILLIPS JH. Expression of Leu-19 (NKH-1) antigen on IL-2 dependent cytotoxic and noncytotoxic cell lines. *J Immunol* 1987; **138**: 2019–2023.
- [31] LANIER LL, TESTI R, BINDL J, PHILLIPS JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 1989; **169**: 2233–2238.
- [32] LANTUEJOL S, MORO D, MICHALIDES RJ, BRAMBILLA C, BRAMBILLA E. Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol* 1998; **22**: 1267–1276.
- [33] LANZA F, BI S, CASTOLDI G, GOLDMAN JM. Abnormal expression of N-CAM (CD56) adhesion molecule: myeloid and progenitor cells from chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1993; **7**: 1570–1575.
- [34] LEVI G, BRODERS F, DUNON D, EDELMAN GM, THIERY JP. Thyroxine-dependent modulations of the expression of the neural cell adhesion molecule N-CAM during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Development* 1990; **108**: 681–692.
- [35] MIGITA K, EGUCHI K, KAWAKAMI A, IDA H, FUKUDA T, KURATA A, ISHIKAWA N, ITO K, NAGATAKI S. Detection of Leu-19 (CD56) antigen on human thyroid epithelial cells by an immunohistochemical method. *Immunol* 1991; **72**: 246–249.
- [36] MAYERHOFER A, LAHR G, GRATZL M. Expression of the neural cell adhesion molecule in endocrine cells of the ovary. *Endocrinology* 1991; **129**: 792–800.
- [37] MOLENAAR WM, MUNTINGHE FLH. Expression of neural cell adhesion molecules and neurofilament protein isoforms in skeletal muscle tumors. *Hum Pathol* 1998; **29**: 1290–1293.
- [38] NITTA T, YAGITA H, SATO K, OKUMARA K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 1989; **170**: 1757–1763.
- [39] ONG F, KAISER U, SEELEN PJ, HERMANS J, WIJERMANS PW, DE-KIEVIET W, JAQUES G, KLUIN-NELEMANS JC. Serum neural cell adhesion molecule differentiates multiple myeloma from paraproteinemias due to other causes. *Blood* 1996; **87**: 712–716.
- [40] PALUCKA AK, PORWIT A, REIZENSTEIN. A supportive role of neural cell adhesion molecule (NCAM) in adhesion between leukaemic blasts and cytotoxic lymphocytes. *Scand J Immunol* 1992; **35**: 399–406.
- [41] PATEL K, MOORE G, DICKSON RJ, ROSSEL RJ, BEVERLEY PC, KEMSHEAD JT, WALSH FS. Neural cell adhesion molecule (NCAM) is the antigen recognized by monoclonal antibodies of similar specificity in small-cell lung carcinoma and neuroblastoma. *Int J Cancer* 1989; **44**: 573–578.
- [42] PATEL K, FROST G, KIELY F, PHIMISTER E, COAKHAM HB, KEMSHEAD JT. Expression of the cluster I antigen (neural cell adhesion molecule) in neuroectodermal tumors. *Br J Cancer* 1991; **63**: 20–23 (suppl).
- [43] PITTET MJ, SPEISER DE, VALMORI D, CEROTTINI JCH, ROMERO P. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol* 2000; **164**: 1148–1152.
- [44] POGGI A. CD56. [w] Kishimoto T et al. [red] Leucocyte Typing VI. White cell Differentiation Antigens. New York, London Garland Publ 1997; 1155–1156.
- [45] POGGI A, ZOCCHI MR. Cultured human thymocytes lacking CD2 and CD11a/CD18 antigens are functional and adhere to endothelial cells via CD56 or CDw49d molecules. *Cell Immunol* 1992; **140**: 319–330.

- [46] RITZ J, SCHMIDT RE, MICHON J, HERCEND T, SCHLOSSMAN SF. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 1988; **42**: 181–211.
- [47] ROBERTSON MJ, CALIGIURI MA, MANLEY TJ, LEVINE H, RITZ J. Human natural killer cell adhesion molecules. *J Immunol* 1990; **145**: 3194–3201.
- [48] ROUGON G, DURBEC P, FIGARELLA-BRANGER D. Adhesion molecules in cancer. *Cancer J* 1992; **5**: 137–141.
- [49] RUTISHAUSER U, ACHESON A, HALL AK, MANN DM, SUNSHINE J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988; **240**: 53–57.
- [50] SASAKI H, YOSHIDA K, IKEDA E, ASOU H, INABA M, OTANI m, KAWASE T. Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors. *Cancer* 1998; **83**: 1921–1931.
- [51] SCHOL DJ, MOOI WJ, VAN DER GUGTEN AA, WAGENAAR SS, HILGERS J. Monoclonal antibody 123C3, identifying small cell carcinoma phenotype in lung tumors, recognizes mainly, but not exclusively, endocrine and neuron-supporting normal tissues. *Int J Cancer* 1988; **2**: 34–40 (Suppl).
- [52] SCHUBERT J, UCIECHOWSKI P, DELANY P, WORDELMANN K, SCHMIDT RE. Heterogeneity of the NKH1 molecule. in: Knapp W. (ed.) Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press 1989: 702–703.
- [53] THOMPSON J, MOORE SE, WALSH FS. Thyroid hormones regulate expression of the neural cell adhesion molecule in adult skeletal muscle. *FEBS Lett* 1987; **219**: 135–138.
- [54] WALSH FS, DOHERTY P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in Axon Growth and Guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; **13**: 425–456.
- [55] VARGAS F, TOLOSA E, SOSPENDRA M, CATALFAMA M, LUCAS-MARTIN A, OBIOLS G, PUJOL-BORRELL R. Characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in thyroid follicular cells: induction by cytokines and over-expression in autoimmune glands. *Clin Exp Immunol* 1994; **98**: 478–488.
- [56] ZOCCHI MR, VIDAL M, POGGI A. Involvement of CD56/N-CAM molecule in the adhesion of human solid tumor cell lines to endothelial cells. *Exp Cell Res* 1993; **204**: 130–135.
- [57] ŻEROMSKI J, BAGNASCOM, PAOLIERI F, DWORACKI G. Expression of CD56 (NKH-1) differentiation antigen in human thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol* 1992; **89**: 472–478.
- [58] ŻEROMSKI J, BICZYSKO M, STAJGIS P, ŁAWNICZAK M, BICZYSKO W. CD56 (NCAM) antigen in glandular epithelium of human thyroid: light microscopic and ultrastructural study. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 11–17.
- [59] ŻEROMSKI J, DWORACKI G, JENEK J, NIEMIR Z, JEŻEWSKA E, JENEK R, BICZYSKO M. Protein and mRNA expression of CD56/N-CAM on follicular epithelial cells of the human thyroid. *Intern J Immunopathol Pharmacol* 1999; **12**: 23–30.
- [60] ŻEROMSKI J, ŁAWNICZAK M, GALBAS K, JENEK R, GOLUSINSKI P. Expression of CD56/N-CAM antigen and some other adhesion molecules in various human endocrine glands. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 119–125.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 05.07.2000 r.

Przyjęto: 25.07.2000 r.

Adres autora: ul. Przybyszewskiego 49, 60 355 Poznań

DETEKCJA I TRANSDUKCJA SYGNAŁU W REAKCJACH ODPORNOŚCIOWYCH ROŚLIN. I. ROZPOZNANIE I WCZESNE ETAPY TRANSDUKCJI SYGNAŁU

SIGNAL DETECTION AND TRANSDUCTION INVOLVED
IN PLANT DISEASE RESISTANCE.

I. RECOGNITION AND EARLY SIGNAL TRANSDUCTION
PATHWAYS

Szczepan JÓZEFOWSKI

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, Instytut Biologii Molekularnej UJ,
Kraków

Streszczenie: Mechanizmy odpornościowe roślin wyższych cechuje duża różnorodność. Następtwem kontaktu z patogenem bywa produkcja reaktywnych form tlenu, modyfikacja ścian komórkowych, lokalne obumieranie komórek o cechach apoptozy, produkcja fitoaleksyn i białek towarzyszących patogenezie (PR). Elicytory są związkami bezpośrednio odpowiedzialnymi za indukcję reakcji odpornościowych roślin. Wśród elicytorów produkowanych przez mikroorganizmy można wyróżnić elicytory specyficzne dla konkretnego szczepu patogenu oraz te występujące powszechnie u wielu patogenów. Po związaniu do receptorów, elicytory inicjują w komórkach roślinnych liczne, wciąż słabo poznane szlaki transdukcji sygnału. W części pierwszej omówiono mechanizmy rozpoznania i niektóre aspekty transdukcji sygnału wczesnych, niezależnych od transkrypcji genów reakcji obronnych roślin, na tle mechanizmów funkcjonujących u innych organizmów.
(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 609–621)

Słowa kluczowe: reakcje odpornościowe, rośliny, transdukcja sygnału, wybuch tlenowy, SAR, HR

Summary: Plants use diverse mechanisms to defend themselves from pathogens that include the generation of reactive oxygen species, cell wall modifications, localized cells death, production of phytoalexins and pathogenesis-related proteins (PR). Specific compounds released during host-pathogen interaction which are directly responsible for triggering of defense responses, are called elicitors. They may be either race-specific or shared by several different pathogens. In the case of race-specific recognition, plant disease resistance (*R*) genes confer an ability to resist infection by pathogens expressing

specific corresponding avirulence (*Avr*) genes. Multiple, still poorly-defined, signaling pathways are set in motion by *R* gene products. In the first part of this review the current state of knowledge concerning recognition mechanisms and early signal transduction pathways in plant defense against infection is presented, and discussed in the context of signal transduction mechanisms functioning in other organisms. (*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 609–621)

Key words: defense responses, plants, signal transduction, respiratory burst, SAR, HR

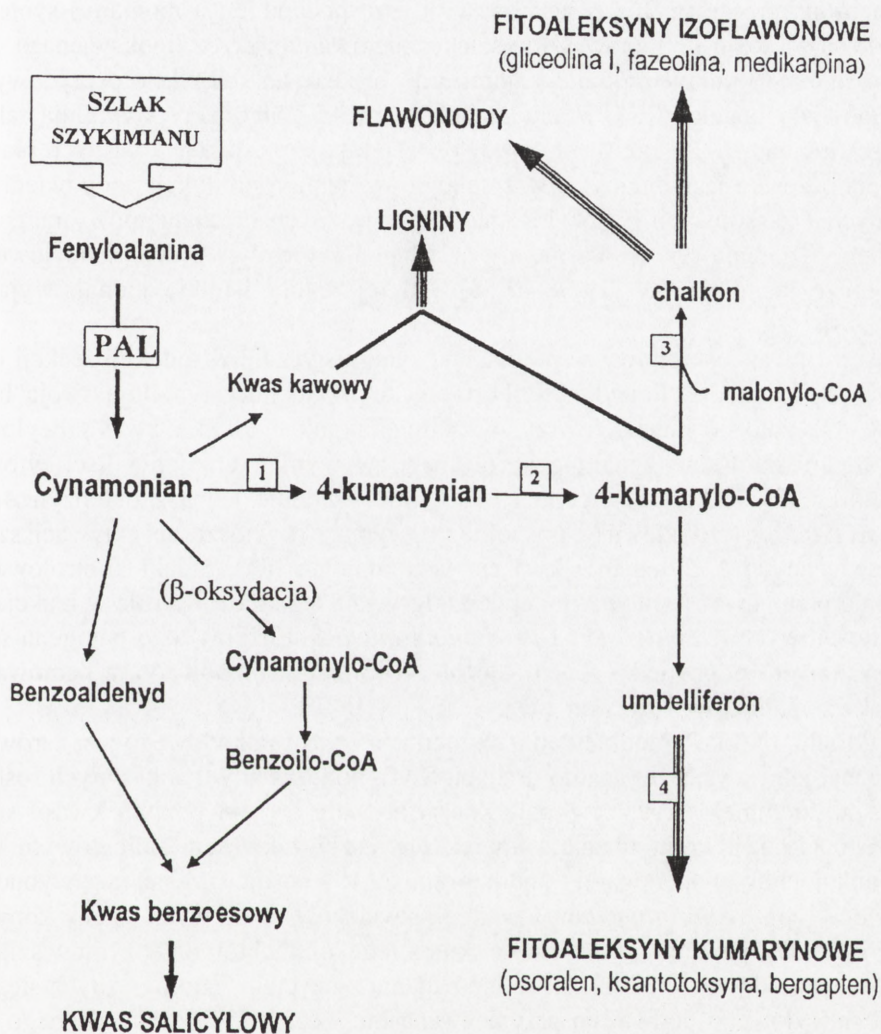
I. FIZJOLOGIA REAKCJI ODPORNOŚCIOWYCH ROŚLIN

Jedno z głównych zagrożeń dla roślin stanowią infekcje wywołane przez pasożytnicze gatunki grzybów, bakterii, wirusów i nicieni. Wytwarzane przez rośliny bariery fizyczne (ściana komórkowa) i biochemiczne (substancje mikrobójcze) chronią je skutecznie przed większością potencjalnych patogenów.

Substancje mikrobójcze. Substancjami mikrobójczymi syntetyzowanymi przez rośliny pod wpływem infekcji są reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Intermediates*), fitoaleksyny, antybiotyki peptydowe (defenzyny, tioniny, białka transferu lipidów, białka inaktywujące rybosomy) i białka związane z patogenezą (ang. *Pathogenesis-Related proteins*, PR). Grupa fitoaleksyn obejmuje kilkaset związków, pod względem chemicznym będących, między innymi, fenolami, terpenoidami, poliacylenami, pochodnymi kwasów tłuszczowych. Kwas salicylowy oraz fitoaleksyny kumarynowe roślin z rodziny baldaszkowatych i fitoaleksyny izoflawonowe roślin motylkowatych są produktami szlaku fenylopropanoidów. Jego pierwszym etapem jest przekształcenie fenyloalaniny w kwas *trans*-cynamonowy, katalizowane przez amoniakolizazę fenyloalaninową (PAL) [6,14,23,60] (rys. 1).

Do tej pory zidentyfikowano kilkanaście grup białek PR, w większości których występują zarówno białka kwaśne, jak i zasadowe. Białka PR-3 (chitynazy) i PR-2 (β -1,3-glukanazy) mają zdolność hydrolizowania głównych składników ścian komórkowych grzybów. Wśród zasadowych białek PR, indukowanych w następstwie zranienia towarzyszącego atakowi roślinożernych zwierząt, występują inhibitory proteaz. Funkcja wielu innych białek PR pozostaje słabo poznana. Kwaśne białka PR najczęściej gromadzone są w zewnątrzkomórkowym matriks, natomiast zasadowe białka PR akumulowane są głównie w wakuolach, w tym konstytutywnie w komórkach korzeni [40,43].

Reakcje nadwrażliwości i systemowa odporność nabyta. Zjawiskami charakterystycznymi dla odporności roślin są tzw. reakcja nadwrażliwości (ang. *Hypersensitive Response*, HR) i systemowa odporność nabyta (ang. *Systemic Acquired Resistance*, SAR). Reakcja nadwrażliwości prowadzi do samobójczej śmierci komórek kontaktujących się z patogenem, co sprzyja ograniczeniu rozprzestrzeniania się infekcji. Następstwem pierwszego kontaktu z patogenem wywołującym HR jest często rozwój SAR, która obejmuje całą roślinę i zapewnia jej długotrwałą oporność



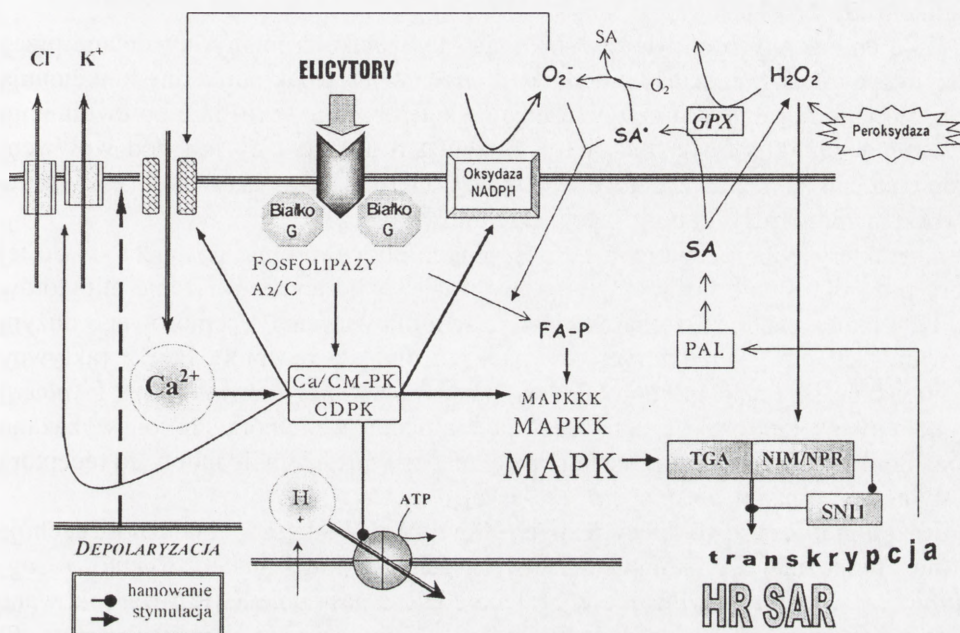
RYSUNEK 1. Schemat metabolizmu fenylpropanoidów, zaznaczono miejsca działania niektórych enzymów: 1 – 4-hydroksylaza cynamonianu, 2 – ligaza 4-kumarynian:CoA, 3 – syntaza chalkonowa, 4 – prenylotransferaza

na szerokie spektrum patogenów. Rozwój SAR związany jest z akumulacją kwasu salicylowego, fitoaleksyn i kwaśnych białek PR. Stwierdzono na przykład istnienie korelacji pomiędzy czasem i stopniem akumulacji mRNA dla białek PR, a czasem i nasileniem SAR. Rozwojowi SAR towarzyszy ponadto wzrost poziomu peroksydaz i gromadzenie w ścianie komórkowej glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę (ang. *Hydroxyproline-Rich Cell Wall Glycoproteins*, HRGPs). Istota tego zjawiska nie jest jednak jeszcze w pełni wyjaśniona [5,22,52].

Hormony stresowe. Kwas jasmonowy i jego pochodne (jasmoniany) syntetyzowane są z kwasu linolenowego w szlaku inicjowanym przez lipoksygenazę. Fitohormon ten warunkuje produkcję inhibitorów proteaz, antybiotyków peptydowych i zasadowych białek PR. U wielu gatunków roślin jasmoniany stymulują także syntezę fitoaleksyn. Z kolei kwas salicylowy indukuje produkcję kwaśnych białek PR. Jednocześnie jasmoniany i kwas salicylowy hamują produkcję, odpowiednio, kwaśnych i zasadowych białek PR. Jednym z ważnych mechanizmów antagonistycznego działania obu fitohormonów jest hamujący wpływ kwasu salicylowego na syntezę jasmonianów [19,38,40,53]. Od tej reguły istnieją jednak wyjątki [30,38,48].

Etylen i kwas jasmonowy współdziałają synergistycznie w indukcji reakcji obronnych na zranienie. Ponadto, fitohormony te wzajemnie stymulują swoją biosyntezę. Okazało się jednak, że przy wysokim poziomie cytokinin, kwas salicylowy staje się mediatorem sygnału generowanego w wyniku zranienia liści tytoniu [19,38,48,53,57]. Aktywacja genu *PDF1.2*, który koduje jedną z defenzyn *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnika pospolitego), wymaga równoczesnej aktywacji szlaków związanych z etylenem i kwasem jasmonowym [47]. Szlaki kontrolowane wspólnie przez kwas jasmonowy i etylen odgrywają też kluczową rolę w reakcjach odpornościowych *Arabidopsis* na *Erwinia carotovora*. Enzymy tego patogenu stymulują ponadto odpowiedzi ściśle zależne od kwasu jasmonowego, a hamowane przez kwas salicylowy i etylen [41].

W tytoniu, ogórku i rzodkiewniku akumulacja kwasu salicylowego jest zarówno konieczna, jak i wystarczająca do indukcji SAR, podczas gdy tkanki innych roślin, takich jak ziemniak i ryż, zawierają konstytutywnie wysoki poziom kwasu salicylowego [19,52]. Preinkubacja komórek pietruszki z kwasem salicylowym lub jego funkcjonalnymi analogami („induktorami SAR”) nasila wczesną fazę wybuchu tlenowego (ang. *respiratory burst*), sekrecję związków fenolowych ściany komórkowej i fitoaleksyn kumarynowych, na skutek indukcji niektórych enzymów szlaku fenylopropanoidowego [32,62]. Ostatnie badania z użyciem fizjologicznych stężeń kwasu salicylowego podważają przypisywaną mu wcześniej rolę niezależnego od patogenu induktora HR i SAR. Kwas salicylowy wydaje się raczej działać we wczesnych fazach indukcji HR, proksymalnie w stosunku do H_2O_2 , zwiększając kompetencję do odpowiedzi (uwrażliwiając) na sygnał pochodzący od patogenu [31,59]. Poprzez zahamowanie aktywności katalazy i peroksydazy askorbinianowej (ale nie peroksydaz guajakolowych, GPX), wzrost poziomu salicylanów prowadzi do akumulacji H_2O_2 . W tych warunkach H_2O_2 uczestniczy w katalizowanej przez GPX reakcji z kwasem salicylowym, której produktami są wolne rodniki kwasu salicylowego (SA^{\cdot}) i anion ponadtlenkowy (O_2^-) – induktory peroksydacji lipidów. Produkty wymienionych reakcji (O_2^- i peroksydy lipidów) mają zdolność indukowania procesów związanych z SAR [4,32] (rys. 2). W indukcji odporności istotny może być wpływ kwasu salicylowego na funkcje mitochondriów (zahamowanie



RYSUNEK 2. Częściowo hipotetyczny model transdukcji sygnału z receptorów dla pospolitych elicytorów w komórkach roślinnych, dla przejrzystości pominięto niektóre szlaki i interakcje: Ca/CM-PKs – kinazy białkowe regulowane przez kompleks wapnia z kalmoduliną, FA-P – nadtlenki kwasów tłuszczowych, TGA, NIM/NPR, SNI1 – czynniki transkrypcyjne (patrz część II artykułu); pozostałe objaśnienia w tekście, schemat skompilowano na podstawie danych z artykułów cytowanych w literaturze

fosforylacji oksydacyjnej i indukcja oksydazy alternatywnej). Inhibitory oddychania indukują odporność na wirus TMV (mozaiki tytoniowej) w roślinach tytoniu i przywracają odporność roślinom *nahG* (niezdolnym do akumulacji kwasu salicylowego na skutek transformowania bakteryjnym genem hydroksylazy salicylanu) [66].

II. ROZPOZNIANIE

Pospolite elicytory. Związki uwalniane w trakcie interakcji z potencjalnym patogenem, bezpośrednio odpowiedzialne za indukcję lub stymulację reakcji odpornościowych w roślinach, nazwano elicytorami (ang. *elicitors*). Tylko w niektórych przypadkach zidentyfikowano aktywne biologicznie składniki nieoczyszczonych preparatów elicytorowych. Pod względem chemicznym są nimi złożone węgło-

wodany ścian komórkowych grzybów (β -glukany, chityna) i roślin, enzymy mikroorganizmów, polipeptydy (elicytyny rodzaju *Phytophthora*, bakteryjna harpina) i glikolipidy [15,34].

Rolę endogennych elicytorów spełniają oligogalaktouroniany, uwalniane przez enzymy patogenów ze ścian komórek roślinnych. Oligogalaktouroniany funkcjonują ponadto jako hormony, które wywołują reakcje obronne w roślinie po uwolnieniu przez endogenną poligalaktouronazę. Enzym ten indukowany jest pod wpływem zranienia lub kontaktu z patogenem [8,15]. Oprócz tego, aktywność elicytorów wykazują monomery kutyny i powierzchniowe woski [21].

Charakterystyka receptorów dla pospolitych elicytorów nie posunęła się do tej pory poza określenie masy cząsteczkowej białek wiążących. Wiązanie elicytorów do tych białek zachodzi z charakterystycznym dla wiązania receptorowego dużym powinowactwem. W niektórych przypadkach, np. dla receptora Pep13 (aktywny biologicznie fragment glikoproteiny z *Pseudomonas megasperma f. sp. glycinea*) w komórkach pietruszki i dla receptora β -glukanu w komórkach soi, wykazano ponadto ilościową i strukturalną korelację między wiązaniem ligandów do receptora a stymulacją reakcji obronnych [12,15,42].

Rozpoznanie rasowo-specyficznych elicytorów. Większa specyficzność cechuje system rozpoznawczy „komplementarnych genów” (ang. „*gene-for-gene*” *recognition system*). W tym wypadku wystąpienie HR, a następnie SAR, uwarunkowane jest interakcją pomiędzy produktami genów odporności (ang. *Resistance gene, R*) gospodarza i genów awirulencji (*Avr*) patogenu. Odporność (interakcja niekompatybilna) występuje wtedy, gdy roślina mająca nierecesywny allel genu *R* wchodzi w interakcję ze szczepem/izolatem patogenu mającym konkretny gen *Avr*. Gdy warunek ten nie jest spełniony, tzn. gdy którykolwiek allel tej pary genów jest recesywny, ma miejsce interakcja kompatybilna, czyli podatność na rozwój infekcji. Gdy dana roślina jest nosicielem wielu genów *R*, choroba rozwija się zwykle tylko wówczas, gdy wszystkie odpowiadające im geny *Avr* patogenu są recesywne [5,13].

III. WCZESNE ETAPY TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Bezpośrednim następstwem rozpoznania patogenu/elicytora przez komórkę roślinną są gwałtowne reakcje zachodzące głównie na peryferiach komórki i nie wymagające ekspresji genów. Są to depolaryzacja błon, przepływ jonów w poprzek błony (wyptyw K^+ i Cl^- , napływ H^+ i Ca^{2+}) oraz wybuch tlenowy. Podłożem tych procesów są zmiany aktywności enzymów błonowych, takich jak: Ca^{2+} -ATPaza, H^+ -ATPaza i oksydaza NADPH, oraz otwarcie kanałów jonowych. Mniej więcej w tym samym czasie występują przejściowe zmiany ufosforylowania białek i uwarunkowana nimi aktywacja genów [9,26,42,51,54].

Białka G. W ostatnim czasie pojawiły się liczne doniesienia wskazujące na udział heterotrimerycznych białek G we wczesnych etapach transdukcji sygnału u roślin, także w odpowiedzi na elicytory. U roślin zidentyfikowano geny kodujące podjednostki białek G [63]. W komórkach pomidora zależne od potencjału kanały Ca^{2+} otwierane były zarówno przez aktywatory białek G, jak i przez rekombinacyjne białko TG α 1, homologiczne do podjednostki α białek G [2]. Wpływ elicytorów na aktywację kanałów Cl^- i K^+ w komórkach świerka imitował peptydowy aktywator białek G – mastoporan. Także wpływ elicytorów na transkrypcję genów blokują inhibitory, a naśladują aktywatory białek G. Stymulowana przez czynniki Nod z *Rhizobium* transkrypcja w epidermie korzeni lucerny blokowana była ponadto przez antagonistów Ca^{2+} i fosfolipazy C [2,26,49]. Rośliny tytoniu transformowane genem aktywatora białek G - toksyny cholery, wykazywały zwiększoną odporność na infekcję, a w ich tkankach stwierdzono akumulację dużej ilości kwasu salicylowego i konstytutywną ekspresję białek PR [7]. Mechanizm aktywacji białek G pod wpływem elicytorów pozostaje zagadką - nie wykryto u roślin receptorów serpentynowych, które współdziałają z białkami G u zwierząt i drożdży.

Nadrodzina małych GTPaz Ras (u zwierząt zaangażowanych w transdukcję sygnału z receptorowych kinaz tyrozynowych) ograniczona jest u roślin tylko do jednej rodziny białek podobnych Rac, która u *A. thaliana* obejmuje co najmniej 10 różnych genów [44,64]. Rośliny tytoniu transformowane genem *rgp1*, kodującym białko typu Ras, produkują nietypowo dużo kwasu salicylowego w odpowiedzi na zranienie, co związane jest ze zwiększoną syntezą kwaśnych białek PR i dużą odpornością na infekcję [53]. Kinazami receptorowymi są prawdopodobnie produkty niektórych genów *R*, jednakże, w przeciwieństwie do zwierzęcych, zawierają one domenę kinazy serynowo-treoninowej.

Wapń jako wtórny przekaźnik. Wapń reguluje wiele funkcji komórek zwierzęcych - w dużym stopniu poprzez wpływ na aktywność kinaz białkowych C (PKC) oraz kinaz zależnych od kalmoduliny. U roślin ich rolę wydaje się pełnić specyficzna dla roślin rodzina kinaz białkowych regulowanych bezpośrednio przez Ca^{2+} (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinases*, CDPKs). Kinazy CDPKs hamowane są przez niespecyficzne inhibitory kinaz białkowych, przez antagonistów kalmoduliny, a także przez inhibitor PKC – kalfostynę C [28,36]. Inhibitory należące do tych kategorii (inhibitory kalmoduliny i staurosporyna) lub usunięcie zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} przeciwdziałają wybuchowi tlenowemu w bulwach ziemniaków [46]. Staurosporyna blokuje również wszystkie znane odpowiedzi komórek tytoniu na kryptogeinę [35]. Inną, regulowaną przez Ca^{2+} i specyficznie roślinną rodzinę kinaz serynowo-treoninowych reprezentują zidentyfikowane ostatnio u rzodkiewnika kinazy regulowane przez białka wiążące wapń typu kalcyneuryny B (ang. *calcineurin B-like Ca^{2+} binding protein*, CBL). W roślinach CBL podlegają selektywnej regulacji pod wpływem różnorodnych stresorów, w tym zranienia [58].

Większość reakcji odpornościowych komórek roślinnych uwarunkowanych jest napływem Ca^{2+} . O specyficznej aktywacji poszczególnych szlaków mogą decydować różnice parametrów oscylacji wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) [16]. Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$ odpowiada za indukuje syntazy β -1,4-glukanowej, syntetyzującej kalozę. Usunięcie z medium Ca^{2+} znosiło stymulowany przez oligogalaktouroniany wpływ K^+ z hodowanych w zawiesinie komórek tytoniu [15]. Także transkrypcję i aktywację amoniakolizazy fenyloalaninowej, wywołaną przez oligogalaktouroniany w protoplastach marchwi, hamowały inhibitory kanałów Ca^{2+} i kalmoduliny. Ponadto inhibitory kalmoduliny przeciwdziały depolaryzacji błony i zakwaszeniu cytoplazmy [39]. W komórkach soi elicytory indukują zależną od Ca^{2+} ekspresję izoform kalmoduliny specyficznie związanych z reakcjami odpornościowymi. Konstytutywna ekspresja tych izoform w roślinach tytoniu prowadziła do spontanicznej HR i niezależnej od kwasu salicylowego ekspresji genów charakterystycznych dla SAR [27]. W efektach tych mogłyby pośredniczyć kinazy typu C CaMK (ang.: *chimeric Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*), która oprócz domeny wiążącej kompleks Ca^{2+} z kalmoduliną, zawiera domenę regulowaną bezpośrednio przez Ca^{2+} [61].

Reaktywne formy tlenu i azotu. W niektórych układach, np. w hodowli komórek soi lub fasoli, wybuch tlenowy stanowi natychmiastową odpowiedź na kontakt z patogenem, podczas gdy w innych, np. w hodowli komórek róży, występuje opóźnienie, trwające minuty, a nawet godziny. Fakt ten tłumaczy się odmiennymi mechanizmami tworzenia H_2O_2 . Sugeruje się, że w komórkach róży H_2O_2 produkowany jest w następstwie aktywacji kompleksu błonowej oksydazy NADPH (analogicznie jak w leukocytach ssaków), podczas gdy w komórkach fasoli źródłem H_2O_2 są bezpośrednio peroksydazy ściany komórkowej [10,11,65]. U roślin wykryto białka homologiczne do składowych kompleksu oksydazy NADPH ssaków [67]. Gen *rbohA* (od ang. *respiratory burst oxidase homolog Arabidopsis*) koduje białko homologiczne do apoproteiny leukocytarnej podjednostki gp91^{phox}. W przeciwieństwie do gp91^{phox}, w *rbohA* występuje jednak dodatkowo duża N-końcowa domena podobna do ludzkiego pierwszego białka aktywującego RanGTPazę i zawierająca dwa motywy *EF-hand*. Istnieje więc potencjalna możliwość bezpośredniej regulacji roślinnej oksydazy przez Ca^{2+} i białka G [33]. Ponadto wapń może wzmacniać natężenie wybuchu tlenowego poprzez zwiększenie podaży NADPH, w wyniku aktywacji regulowanej przez kalmodulinę kinazy NAD [25].

Wybuch tlenowy w komórkach pomidorów hamowany był przez staurosporynę, antagonistów kalmoduliny i przez chelator wapnia, natomiast bez wpływu były farmakologiczne manipulacje aktywnością PKC. Podobnie jak PKC, także fosfolipaza D jest aktywatorem wybuchu tlenowego w leukocytach, lecz raczej nie w komórkach roślinnych. Ani cykliczny AMP, ani fosforany inozytoli prawdopodobnie nie są zaangażowane w transdukcję sygnału elicytora glukanowego, natomiast w inicjacji wybuchu tlenowego w komórkach soi wydają się uczestniczyć białka G

i fosfolipaza C. Inhibitory fosfolipazy A_2 hamowały wybuch tlenowy towarzyszący interakcji Cf9/avr9 w komórkach pomidorów [15,37,55,56,67].

Rodniki tlenowe tworzone w trakcie wybuchu tlenowego – głównie O_2^- , H_2O_2 i rodnik hydroksylový ($\cdot OH$) – oprócz działania mikrobójczego, wywołują katalizowane przez peroksydazę krzyżowe wiązanie glikoprotein HRGPs w ścianie komórkowej. Związane są również z indukcją HR i spełniają rolę przekaźnika, aktywującego w sąsiednich komórkach antyoksydacyjne enzymy ochronne, takie jak S-transferaza glutationowa [18,29,37].

Wybuch tlenowy w trakcie interakcji niekompatybilnej zachodzi zwykle w dwóch etapach. Inicjacja HR zwykle następuje bezpośrednio po drugim, masywniejszym wybuchu, który wydaje się niezbędny do wystąpienia HR. Inokulacja liści rzodkiewnika awirulentnym *Pseudomonas syringae* oprócz HR indukuje także wtórne wybuchy tlenowe w grupach komórek oddalonych tkanek, prowadzące do niskiej częstotliwości ogólnoustrojowych mikro-HR. Zarówno pierwotny wybuch tlenowy, jak i wtórne mikro-wybuchy okazały się także konieczne do indukcji SAR [1,3]. Podobnie, wywołana przez zranienie produkcja H_2O_2 zachodzi zarówno lokalnie, jak i w oddalonych liściach. Mediatorami prowadzącymi do produkcji H_2O_2 pod wpływem zranienia wydają się być kolejno: systemina, kwas jasmonowy i oligogalaktouroniany [45].

Badania na mutantach *hrmA P. syringae pv syringae*, które pomimo stymulowania normalnej, dwufazowej produkcji rodników tlenowych, nie wywołują HR na liściach tytoniu ani też obumierania komórek hodowanych w zawieszynie, podważają jednak główną rolę H_2O_2 w indukcji HR [24]. W przeciwieństwie do komórek pietruszki, wybuch tlenowy nie jest również konieczny do zainicjowania produkcji fitoaleksyn w komórkach soi, tytoniu i rzodkiewnika [18,38,55].

Tlenek azotu, stymulujący apoptozę w komórkach ssaków, prawdopodobnie współuczestniczy w indukcji HR w komórkach roślinnych. W komórkach soi synergistyczne działanie NO i H_2O_2 jest niezbędne i wystarczające do aktywacji genów obronnych i indukcji HR. Tlenek azotu wiązany jest też z indukcją ekspresji amoniakolizazy fenyloalaninowej i białek PR w komórkach tytoniu zainfekowanych TMV. Tak jak w organizmach zwierząt, w aktywacji genów pod wpływem NO mogłyby pośredniczyć cGMP i cykliczna ADP-ryboza [17,20,55]. Chociaż stwierdzono u roślin zależną od Ca^{2+} aktywność enzymatyczną syntazy NO, to nie ustalono jeszcze ostatecznie źródła i mechanizmu indukującego produkcję NO w roślinach [11,50].

LITERATURA

- [1] ABLE AJ, GUEST DI, SUTHERLAND MW. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiol* 1998; **117**: 491–499.

- [2] AHARON GS, GELLI A, SNEDDEN WA, BLUMWALD E. Activation of a plasma membrane Ca^{2+} channel by $\text{TG}\alpha 1$, a heterotrimeric G protein α -subunit homologue. *FEBS Lett* 1998; **424**: 17–21.
- [3] ALVAREZ ME, PENNELL RI, MEIJER PJ, ISHIKAWA A, DIXON RA, LAMB C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 1998; **92**: 773–784.
- [4] ANDERSON MD, CHEN ZX, KLESSIG DF. Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochemistry* 1998; **47**: 555–566.
- [5] BAKER B, ZAMBRYSKI P, STASKAWICZ B, DINESH-KUMAR SP. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 1997; **276**: 726–733.
- [6] BARZ W, BLESS W, BORGER-PAPENDORF G et al. Phytoalexins as part of induced defence reactions in plants: their elicitation, function and metabolism. *Ciba Found Symp* 1990; **154**: 140–156.
- [7] BEFFA AF, SZELL M, MEUWLY P et al. Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J* 1995; **14**: 5753–5761.
- [8] BERGEY DR, OROZCO-CARDENAS M, DE MOURA DS., RYAN CA. A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1756–1760.
- [9] BLUMWALD E, AHARON GS, LAM BC-H. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 342–346.
- [10] BOLWELL GP, DAVIES DR, GERRISH C, AUH C-K, MURPHY TM. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1379–1385.
- [11] BOLWELL GP. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 287–294.
- [12] BORQUE S, BINET MN, PONCHET M, PUGIN A, LEBRUN-GARCIA A. Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34699–34705.
- [13] BOTELLA MA, PARKER JE, FROST LN, BITTNER-EDDY PD, BEYNON JL, DANIELS MJ, HOLUB EB, JONES JD. Three genes of the *Arabidopsis* RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell* 1998; **10**: 1847–1860.
- [14] COQUOZ J-C, BUCHALA A, METRAUX J-P. The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1095–1101.
- [15] COTE F, HAM K-S, HAHN MG, BERGMANN CW. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions: Generation, perception, and signal transduction. [w] Biswas BB, Das HK [red.] *Subcellular Biochemistry*. Vol. 29: Plant-Microbe Interactions. New York and London: Plenum Press 1998: 385–432.
- [16] DE KONINCK P, SCHULMAN H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations. *Science* 1998; **279**: 227–230.
- [17] DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998; **394**: 585–588.
- [18] DESIKAN R, REYNOLDS A, HANCOCK JT, NEILL SJ. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* 1998; **330**: 115–120.
- [19] DONG X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 316–323.
- [20] DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10328–10333.
- [21] FAUTH M., SCHWEIZER P, BUCHALA A, MARKSTÄDTER C, RIEDERER M, KATO T, KAUSS H. Cutin monomers and surface wax constituents elicit H_2O_2 in conditioned

- cucumber hypocotyl segments and enhance the activity of other H₂O₂ elicitors. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1373–1380.
- [22] GARCIA-MUNIZ N, MARTINEZ-IZQUIERDO JA, PUIGDOMENECH P. Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 623–632.
- [23] GARCÍA-OLMEDO F, MOLINA A, ALAMILLO JM, RODRÍGUEZ-PALENZUÉLA P. Plant defense peptides. *Biopolymers* 1998; **47**: 471–491.
- [24] GLAZENER JA, ORLANDI EW, BAKER JC. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol* 1996; **110**: 759–763.
- [25] HARDING SA, OH SH, ROBERTS DM. Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J* 1997; **16**: 1137–1144.
- [26] HEBE G, HAGER A, SALZER P. Initial signalling processes induced by elicitors of ectomycorrhiza-forming fungi in spruce cells can also be triggered by G-protein-activating mastoparan and protein phosphatase-inhibiting cantharidin. *Planta* 1999; **207**: 418–425.
- [27] HEO WD, LEE SH, KIM MC, et al. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 766–771.
- [28] HRABAK EM, DICKMANN LJ, SATTERLEE JS, SUSSMAN MR. Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molec Biol* 1996; **31**: 405–412.
- [29] HÜCKELHOVEN R, FODOR J, PREIS C, KOGEL K-H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1251–1260.
- [30] IMANISHI S, NAKAKITA M, YAMASHITA K, et al. Aspirin and salicylic acid do not inhibit methyl jasmonate-inducible expression of a gene for ornithine decarboxylase in tobacco BY-2 cells. *Biosci Biotech Biochem* 2000; **64**: 125–133.
- [31] KATZ VA, THULKE OU, CONRATH U. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1333–1339.
- [32] KAWANO T, SAHASHI N, TAKAHASHI K, UOZUMI N, MUTO S. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: The earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 721–730.
- [33] KELLERA T, DAMUDEA HG, WERNERB D, DOERNERA P, DIXONC RA, LAMBA C. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 1998; **10**: 255–266.
- [34] KNOGGE W. Plant-fungal interactions and plant disease. [w] Biswas BB, Das HK [red.] Subcellular Biochemistry. Vol. 29: Plant-Microbe Interactions. New York and London: Plenum Press 1998: 215–251.
- [35] LEBRUN-GARCIA A, OUAKED F, CHILTZ A, PUGIN A. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* 1998; **15**: 773–781.
- [36] LEE J-Y, YOO B-C, HARMON AC. Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry* 1998; **37**: 6801–6809.
- [37] LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, LAMB C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease response. *Cell* 1994; **79**: 583–593.
- [38] MALECK K, DIETRICH RA. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 215–219.
- [39] MESSIAEN J, VAN CUTSEM P. Pectic signal transduction in carrot cells: Membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiol* 1994; **35**: 677–689.

- [40] NIKI T, MITSUWARA I, SEO S, OHTSUBO N, OHASHI Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 500–507.
- [41] NORMAN-SETTERBLAD C, VIDAL S, PALVA ET. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant-Microb Interact* 2000; **13**: 430–438.
- [42] NÜRNBERGER T, NENNSTIEL D, JABS T, SACKS WR, HAHLBROCK K, SCHEEL D. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 1994; **78**: 449–460.
- [43] OHASHI Y, OHSHIMA M. Stress-induced expression of genes for pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 819–826.
- [44] O'NEILL LA, GREENE C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 650–657.
- [45] OROZCO-CARDENAS M, RYAN CA. Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6553–6557.
- [46] PARK H-J, MIURA Y, KAWAKITA K, YOSHIOKA H, DOKEN. Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor-induced local oxidative burst in potato tuber slices. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 1218–1225.
- [47] PENNINGCKX IAMA, THOMMA BPHJ, BUCHALA A, METRAUX J-P, BROEKAERT WF. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998; **10**: 2103–2114.
- [48] PIETERSE CMJ, VAN LOON LC. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 52–58.
- [49] PINGRETA J-C, JOURNETA E-P, BARKERA DG. *Rhizobium* Nod factor signaling: evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell* 1998; **10**: 659–672.
- [50] RIBEIRO EA, CUNHA FQ, TOMASHIRO WMSC, MARTINS IS. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* 1999; **445**: 283–286.
- [51] ROOS W, EVERS S, HIEKE M, TSCHÖPE M, SCHUMANN B. Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids phytoalexin biosynthesis in cultured cells of *Escholtzia californica*. *Plant Physiol* 1998; **118**: 349–364.
- [52] RYALS JA, NEUENSCHWANDER UH, WILLITS MG, MOLINA A, STEINER H-Y, HUNT MD. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1996; **8**: 1809–1819.
- [53] SANO H, SEO S, ORUDGEV E, YOUSSEFIAN S, ISHIZUKA K, OHASHI Y. Expression of the gene for a small GTP binding protein in transgenic tobacco elevates endogenous cytokinin levels, abnormally induces salicylic acid in response to wounding, and increases resistance to tobacco mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10556–10560.
- [54] SCHALLER A, OECKINGB C. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 1999; **11**: 263–272.
- [55] SCHEEL D. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 305–310.
- [56] SCHROEDER-TAYLOR AT, LOW PS. Phospholipase D involvement in the plant oxidative burst. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **237**: 10–15.
- [57] SEO S., SANO H, OHASHI Y. Jasmonic acid in wound signal transduction pathway. *Physiol Plant* 1997; **101**: 740–745.
- [58] SHI JR, KIM, KN, RITZ O, ALBRECHT V, GUPTA R, HARTER K, LUAN S, KUDLA J. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 2393–2405.

- [59] SHIRASU K, NAKAJIMA H, RAJASEKHAR VK, DIXON RA, LAMB C. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 1997; **9**: 261–270.
- [60] STIRPE F, BARBIERI L, BATELLI MG, SORIA M, LAPPI DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects. *Biotechnology* 1992; **10**: 405–412.
- [61] TAKEZAWA D, RAMACHANDIRAN S, PARANJAPE V, POOVAIAH BW. Dual regulation of chimeric plant serine/threonine kinase by calcium and calcium/calmodulin. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8126–8132.
- [62] THULKE OU, CONRATH U. Salicylic acid has a dual role in the activation of defense-related genes in parsley. *Plant J* 1998; **14**: 35–42.
- [63] WEISS CA, GARNAAT CW, MUKAI K, HU Y, MA H. Isolation of cDNAs encoding nucleotide-binding protein β -subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9554–9558.
- [64] WINGE P, BREMBU T, BONES AM. Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 483–495.
- [65] WOJTASZEK P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 1997; **322**: 681–692.
- [66] XIE Z, CHEN Z. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol* 1999; **120**: 217–225.
- [67] XING T, HIGGINS VJ, BLUMWALD E. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* 1997; **9**: 249–259.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 19.06.2000 r.

Przyjęto: 17.08.2000 r.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3/230, 30-060 Kraków

DETEKCJA I TRANSDUKCJA SYGNAŁU W REAKCJACH ODPORNOŚCIOWYCH ROŚLIN. II. AKTYWACJA TRANSKRYPCJI GENÓW

SIGNAL DETECTION AND TRANSDUCTION INVOLVED IN PLANT DISEASE RESISTANCE. II. DEFENSE GENE ACTIVATION

Szczepan JÓZEFOWSKI

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, Instytut Biologii Molekularnej UJ,
Kraków

Streszczenie: Zjawiskami charakterystycznymi dla odporności roślin są tzw. reakcja nadwrażliwości (ang. *Hypersensitive Response*, HR), prowadząca do samobójczej śmierci komórek kontaktujących się z patogenem, oraz rozwijająca się często w jej następstwie systemowa odporność nabyta (ang. *Systemic Acquired Resistance*, SAR). Zarówno wystąpienie HR, jak i rozwój SAR uwarunkowane są aktywacją transkrypcji genów. Szlaki łączące receptory z ekspresją genów są przedmiotem drugiej części artykułu. Między innymi, omówiono strukturę i funkcje produktów genów *R*, zapewniających roślinom specyficzną odporność na niektóre szczepy patogenów.
(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 623–631)

Słowa kluczowe: reakcje odpornościowe, rośliny, transdukcja sygnału, kinazy MAP, SAR, HR

Summary: Both the localized, programmed host cell death, so-called hypersensitive response (HR), and the subsequent development of long-lasting, broad-spectrum resistance throughout the plant known as systemic acquired resistance (SAR) – the phenomena characteristic of plant defense response - depend on new gene expression. The second part of this review concerns signal transduction pathways that link specific receptors with defense gene activation. Among others, the structure and functions of disease resistance (*R*) gene products, which confer on plants an ability to resist infection by pathogens expressing specific corresponding avirulence (*Avr*) genes, are discussed.
(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 623–631)

Key words: defence responses, plants, signal transduction, MAP kinases, SAR, HR

I. KASKADY KINAZ BIAŁKOWYCH

W komórkach zwierząt i drożdży kaskady kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK) tworzą główne szlaki łączące receptory błonowe z ekspresją genów. Kinazy MAP pośredniczą w działaniu receptorów serpentynowych (z siedmioma domenami transbłonowymi), receptorowych kinaz tyrozynowych oraz zakotwiczonych w błonie kinaz histydynowych. Kinazy kinaz MAPK (MEKK, Raf, STE11) – pierwszy element kaskady – wchodzi w interakcje z małymi GTP-azami Ras, białkami 14-3-3, kinazami typu NIK (NIK, Ste20, PAK) i regulatorami odpowiedzi dwustopniowego układu regulacyjnego [11,21,32] (rys. 1). U roślin zidentyfikowano liczne geny homologiczne do kinaz MAP [19], a w jednej z prac wykazano ponadto interakcje pomiędzy kolejnymi składnikami kaskady [12]. Ciągłe jednak nie zidentyfikowano ogniw łączących receptory z kinazami MAP, a w wielu przypadkach nie udało się dotychczas określić nawet typu receptora odpowiedzialnego za ich aktywację.

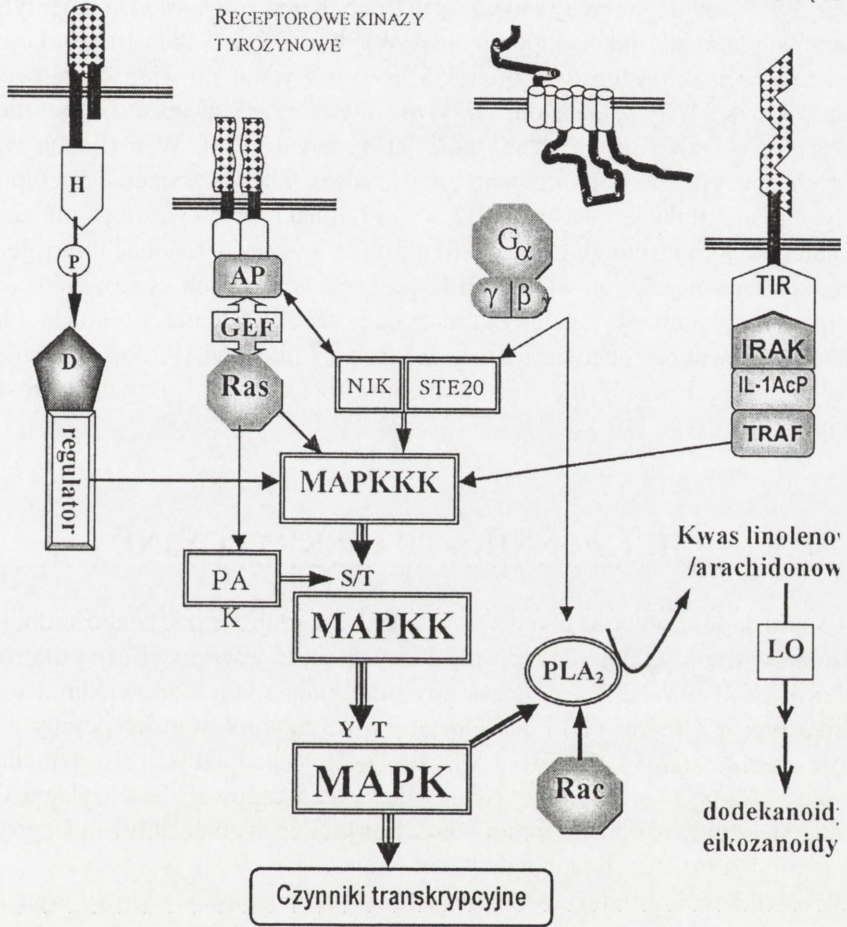
Uwarunkowana napływem Ca^{2+} i fosforylacją białek aktywacja kinazy zasadowego białka mieliny (substrat kinaz MAP) w komórkach tytoniu traktowanych elicytorem uzyskanym z *Phytophthora infestans* hamowana jest przez te same inhibitory co ekspresja genów [29]. Późniejsze badania na tym samym gatunku wykazały, że w odpowiedzi na szereg elicytorów, a także zranienie, w ciągu kilku minut aktywowana jest kinaza SIP (od ang. *SA-Induced Protein*), być może tożsama z opisaną poprzednio kinazą zasadowego białka mieliny. Aktywacja SIPK zachodzi równolegle do alkalizacji medium i ekspresji genu amoniakolizazy fenyloalaninowej (PAL) lub nieznacznie je poprzedza, zaś jej zablokowanie hamuje oba wydarzenia. W komórkach traktowanych elicytyną następuje także późniejsza aktywacja dwóch innych kinaz, o masach 44 i 40 kDa. Zdolność do ich aktywacji korelowała ze zdolnością danego typu elicytora do wywoływania reakcji nadwrażliwości (HR). Kinaza SIP wydaje się więc uczestniczyć w indukcji wczesnych reakcji odpornościowych (alkalizacja medium, ekspresja genu amoniakolizazy fenyloalaninowej), podczas gdy kinazy 44 i 40 kDa mogą pośredniczyć w HR [34].

W ciągu zaledwie minuty od momentu zranienia następuje w tytoniu ogólnoustrojowa aktywacja transkrypcyjna kinazy WIP (od ang. *Wound-Induced Protein*). Kinaza WIP wykazuje znaczną homologię sekwencji do szkurzej ERK2 [28]. Kinazy SIP i WIP reprezentują dwie odrębne podgrupy roślinnych MAPK. Białka typu SIPK mają dodatkową N-końcową sekwencję i w przeciwieństwie do kinaz podgrupy WIPK nie są indukowane przez bodźce na poziomie mRNA [34]. Aktywacja SIPK, ale nie WIPK, następuje pod wpływem kwasu salicylowego i tlenu azotu, działającego za pośrednictwem kwasu salicylowego. Kwas jasmonowy i etylen nie aktywują żadnej z tych kinaz [16]. Zidentyfikowano też kinazę kinaz MAP – SIPKK (*SIPK kinase*) wchodzącą w interakcje z SIPK, ale nie z WIPK [20].

DWUCZŁONOWY UKŁAD
TRANSDUKCJI SYGNAŁU

RECEPTORY
SERPENTYNOWE

RECEPTORY
Z DOMENĄ TI



RYSUNEK 1. Szlaki transdukcji sygnału angażujące kaskady kinaz MAP w komórkach *Eukaryota*. Kinazy MAP aktywowana są przez receptory serpentynowe (np. białka STE2 i STE3 drożdży), receptory kinazy tyrozynowe (np. receptory EGF i PDGF), regulatory odpowiedzi dwustopniowego układu transdukcji sygnału (Ssk1p z drożdży, ETR1 z *A. thaliana*) i receptory z domeną TIR. Aktywacja MAPK następuje pod wpływem podwójnej fosforylacji sąsiadujących Tyr i Thr, której dokonują kinazy kinaz MAP (MAPKK). Wcześniej MAPKK aktywowane są w następstwie fosforylacji Ser lub Thr, katalizowanej przez kinazy MAPKK (MAPKKK): AP – białka adaptorowe (ang. *adaptor protein*), zawierające domeny SH2 i SH3 (u ssaków: Grb-2, Nck, podjednostka p85 3-kinazy fosfatydyloinozytoli, TRAF), GEF – czynnik wymiany GTP-GDP (np. Ost, Dbl), IL-1AcP – *IL-1 receptor Accessory Protein*, LO – lipoksygenaza, NIK – *Nck-Interacting Kinase*, PAK – *p21-Activated Kinase*, Ras – małe białka G z rodziny Ras i Rho nadrodziny Ras, litery oznaczają reszty aminokwasowe: D – kwasu asparaginowego, H – histydyny, S – seryny, T – treoniny, Y – tyrozyny

Raptowna, post-translacyjna aktywacja kinaz zasadowego białka mieliny o masach 46 i 48 kD w komórkach tytoniu pod wpływem Avr9 zależała od napływu Ca^{2+} i fosforylacji białek. Żadna z tych kinaz nie była związana ze stymulowaną przez Avr9 produkcją reaktywnych form tlenu. Kinazy 46 i 48 kDa zidentyfikowano immunochemicznie jako, odpowiednio, WIPK i SIPK. Szlaki transdukcji sygnału generowanego w następstwie interakcji R-Avr wydają się więc krzyżować na poziomie kinaz MAP ze szlakami aktywowanymi przez niespecyficzne elicytory, a nawet przez bodźce abiotyczne, takie jak zranienie [23]. W roślinach tytoniu, w których specyficznie zablokowano transkrypcję WIPK, zranienie nietypowo wywoływało akumulację kwasu salicylowego i transkrypcję kwaśnych białek PR. Odwrotnie, poziom jasmonianów był kilkukrotnie wyższy w roślinach transgenicznych z konstytutywnie aktywowaną WIPK [28]. W komórkach ssaków aktywność fosfolipazy A_2 , katalizującej etap ograniczający szybkość syntezy eikozanoidów, znacznie wzrasta w następstwie fosforylacji przez kinazy MAP. Analogicznie, WIPK mogłaby stymulować syntezę jasmonianów fosforylując i aktywując roślinną fosfolipazę A_2 (rys. 1).

II. CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Ekspresja genów związanych z odpornością znajduje się pod bezpośrednią kontrolą czynników transkrypcyjnych, spośród których część jest specyficzna dla roślin (np. białka EREBP i WRKY), podczas gdy inne mają swoje odpowiedniki u zwierząt (białka typu bZIP i MYB) [24]. Opisany u soi czynnik transkrypcyjny typu bZIP (*basic leucine zipper*), G/HBF-1, wiąże się do sąsiadujących *cis* elementów typu G-box i H-box w promotorze genu syntazy chalconowej. Fosforylacja G/HBF-1 wydaje się stanowić końcowy etap szlaku transdukcji sygnału aktywującego wczesne, zależne od transkrypcji odpowiedzi obronne [7].

W rzodkiewniku indukcja ekspresji *PR-1* przez kwas salicylowy wymaga przyłączenia do regionu promotorowego białka z rodziny TGA, reprezentującego klasę bZIP czynników transkrypcyjnych. Białko NIM1/NPR1 wiąże się zarówno z regionem promotorowym *PR-1*, jak i z niektórymi przedstawicielami rodziny TGA, a interakcja ta wzmaga wiązanie TGA do promotora genu *PR-1* [5]. U mutantów *npr1*, mutacja białka SNI1 przywraca zdolność do indukcji ekspresji *PR*, co sugeruje, że niezmutowane białko SNI1 jest negatywnym regulatorem transkrypcji. Indukcja ekspresji białek PR przez kwas salicylowy może więc angażować dwa odrębne szlaki: prowadzący do inaktywacji SNI1 za pośrednictwem NPR1 i do aktywacji pozytywnego czynnika regulacyjnego (prawdopodobnie TGA) – przez NPR1 ułatwianego [18].

III. STRUKTURA I FUNKCJE BIAŁEK R

Interpretację molekularną genetycznego zjawiska współzależności komplementarnych genów mógłby stanowić model receptor-ligand, w którym produkt genu *R* jest receptorem, a produkt genu *Avr* ligandem. Stwierdzono na przykład korelację między powinowactwem różnych mutantów AVR9 do miejsc wiążących w błonach komórkowych, a ich zdolnością do wywoływania HR [15]. Do tej pory bezpośrednią interakcję *R-Avr* wykazano jednak tylko w jednym przypadku (*Pto-AvrPto*). Produkty niektórych genów *Avr* (np. *AvrPto*) są prawdopodobnie dostarczane przez patogeny bezpośrednio do wnętrza komórki roślinnej i dopiero na terenie cytoplazmy wchodzi w interakcje z białkami *R* [31]. Struktura białek z rodziny *AvrBs3* sugeruje możliwość ich bezpośredniego wpływu na transkrypcję [37].

Na podstawie struktury wyróżnia się pięć klas białek (genów) *R* (tab.1). Białka te zawierają zwykle w C-końcowej części powtórzenia bogate w leucynę (ang. *Leucine-Rich Repeats*, LRR), sekwencje wiązania nukleotydów (NBS), natomiast N-końcowy region zawiera motywy suwaka leucynowego (LZ), domenę serynowo-treoninowej kinazy białkowej albo domenę TIR. Typową dla LRR funkcją jest pośredniczenie w interakcjach białko-białko lub wiązanie ligandów [2,14]. Sugerowano na przykład, że C-końcowy region w *Cf-2*, wykazujący znaczną homologię do *Cf-9*, mógłby być w obu białkach odpowiedzialny za transdukcję sygnału, podczas gdy zmienne, N-końcowe LRR uczestniczyłyby w specyficznym wiązaniu elicytorów [6]. Sekwencje wiązania nukleotydów występują w ATPazach, białkach *G* i w czynnikach elongacyjnych [26].

Białka kodowane przez geny typów *Pto* i *Cf* mogłyby łącznie tworzyć dwuelementowy system receptorowy, ekwiwalentny transbłonowej kinazie *Xa21* z czwartej klasy białek *R* (tab. 1). Dla funkcji *Pto* niezbędny jest produkt genu *Prf*, podczas gdy inna kinaza serynowo-treoninowa – *Pti1*, jest przez *Pto* fosforylowana w procesie prowadzącym do HR. Udowodniono bezpośrednie wiązanie *avrPto* do subdomeny katalitycznej *Pto*. Sama nadekspresja *Pto* wystarcza do wywołania w pomidorach reakcji odpornościowych charakterystycznych dla interakcji *Pto-AvrPto*: mikroskopowych ognisk martwicy komórek, akumulacji kwasu salicylowego, zwiększonej ekspresji genów, odkładania kalozy i lignifikacji, w połączeniu ze zwiększeniem odporności na infekcje [10,30,35]. Także białka kodowane przez geny *Pti4/5/6*, mające cechy typowe dla czynników transkrypcyjnych, wchodzi w fizyczną interakcję z *Pto*. Białka *PTI4/5/6* są homologiczne do białek z rodziny *EREBP* (od ang. *Ethylene-Responsive Element-Binding Proteins*) i tak jak białka *EREBP* wiążą się specyficznie do miejsc promotorowych genów *PR*. Ekspresja genów *PR* i *EREBP* ulega specyficznemu nasileniu pod wpływem interakcji *Pto-AvrPto* [36].

Białka należące do pierwszej klasy białek *R*, takie jak białko *N* z tytoniu, *L6* z *Inu* oraz *Rpp1* i *Rpp5* z rzodkiewnika, zawierają domenę TIR (*Toll*, *IL-1*, *re-*

TABELA 1. Klasyfikacja genów R

Klasa	Charakterystyka	Struktura	Przykład	Komplementarny gen <i>Avr</i>
I	Białka cytoplazmatyczne zawierające LRR i NBS	LZ-NBS-LRR LZ-NBS-LRR TIR-NBS-LRR	<i>RPS2</i> (A) <i>Prf</i> (P) <i>RPP5</i> (A)	<i>AvrRpt2</i> (<i>Pseudomonas syringae</i>) <i>AvrPto</i> (<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>) <i>Noco2</i> (<i>Peronospora parasitica</i>)
II	Pto wykazuje homologię do kinaz Raf, IRAK i Pelle	kinazaS/T	Pto (P)	<i>AvrPto</i> (<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>)
III	Receptor błonowy z dużą domeną zewnętrzną, zbudowaną głównie z LRR	LRR-TM	<i>Cf-9</i> (P) <i>Cf-2</i> (P)	<i>Avr9</i> (<i>Cladosporium fulvum</i>) <i>Avr2</i> (<i>Cladosporium fulvum</i>)
IV	Transbłonowy receptor: domena zewnętrzna z LRR i wewnątrzkomórkowa domena kinazowa	LRR-TM-kinazaS/T	<i>Xa21</i> (ryż)	?(<i>Xanthomonas ozyrae</i>)
V	Inaktywuje toksynę patogenu	Reduktaza	<i>HMI</i> (kukurydza)	żaden (<i>Cochliobolus carbonum</i>)

A – *Arabidopsis*, P – pomidor, TIR – region o homologii do Toll-IL-1R, LZ – sekwencje suwaka leucynowego (*leucine zipper*), kinazaS/T – domena kinazy serynowo-treoninowej, TM – α -helikalna domena transbłonowa, LRR – powtórzenia bogate w leucynę (*leucine-rich repeats*), NBS – sekwencje wiązania nukleotydów (*nucleotide binding sequences*).

sistance), występującą ponadto w receptorze interleukiny 1 (IL-1R) i w receptorze *Toll*, odpowiedzialnym za aktywację morfogenu *dorsal* w zarodkach *Drosophila*. Domeny kinazowe Pto i Xa21 łączy z kolei homologia z kinazami IRAK (uczestniczącymi w transdukcji sygnału z IL-1R) i z produktem *Pelle* (współdziałającym z *Toll*) [2,4,22].

Kinazy IRAK (ang. *IL-1 Receptor-Associated Kinases*) pośredniczą we wpływie IL-1R na indukcję AP1 (Jun/Fos) oraz na aktywację kinaz MAP i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Dimeryczne czynniki transkrypcyjne z domenami Rel, do których oprócz NF- κ B należą też *Dorsal* i *Dif* z *Drosophila*, zatrzymywane są w cytoplazmie dzięki połączeniu z inhibitorami zawierającymi powtórzenia ankyrynowe (I- κ B, *Cactus*, *Relish*) [21]. Okazało się, że gen *NIM1/NPR1* z *A. thaliana* koduje białko zawierające powtórzenia ankyrynowe, homologiczne do tych występujących w I- κ B i *Cactus*. Produkt tego genu okazał się niezbędny do aktywacji lokalnych mechanizmów obronnych i do rozwoju SAR, a mutacje *npr1* i *nim1* blokują działanie kwasu salicylowego w tym zakresie [25].

W procesie aktywacji NF- κ B, fosforylowany i sprzężony z ubikwitiną I- κ B podlega proteolizie w proteosomach [27]. W tytoniu ekspresja genu *tc17*, kodującego podjednostkę β proteosomów, ulega nasileniu pod wpływem elicytyn, kwasu salicylowego lub H₂O₂. Zahamowanie transkrypcji *tc17* u roślin *nahG* skorelowane było z niezdolnością do indukcji SAR, co sugeruje udział proteosomów w tym

procesie [8]. Także stymulowany przez induktory SAR rozwój kompetencji do produkcji H_2O_2 w komórkach ogórka hamują specyficzne inhibitory proteosomów. Inhibitory tego typu przeciwdziałają także ekspresji chitynazy w komórkach ogórka i genów indukowanych przez zranienie w roślinach tytoniu [3,13].

W komórkach rzodkiewnika rodzaj N-końcowej domeny białek R z pierwszej klasy determinuje typ transdukcji inicjowanego przez nie sygnału. Funkcja białek R z domeną TIR, ale nie tych zawierających LZ, uwarunkowana jest obecnością produktu genu *EDS1*, zawierającego domenę homologiczną do domeny katalitycznej lipaz. W transdukcji sygnału z białek R, *EDS1* prawdopodobnie funkcjonuje proksymalnie w stosunku do kwasu salicylowego. Odwrotnie, mutacja genu *NDR1*, który koduje małe białko z dwiema domenami transbłonowymi, znosi odporność zależną od genów R typu LZ-NBS-LRR, ale nie tych z domeną TIR (tab. 1)[1,9].

Ostatnio wykazano, że zarodkowy szlak regulacyjny *Drosophila* związany z *Toll*, w dorosłym życiu owada warunkuje syntezę peptydów grzybobójczych [17], a w leukocytach ssaków receptor podobny do *Toll*: TLR2 (*Toll-like receptor 2*) odpowiada za transbłonową transdukcję sygnału dostarczanego przez lipopolisacharydy ścian bakterii Gram-ujemnych [33]. Tak więc mechanizmy obronne wszystkich wyższych *Eukaryota* angażują homologiczne szlaki regulacyjne.

LITERATURA

- [1] AARTS N, METZ M, HOLUB E, STASKAWICZ BJ, DANIELS MJ, PARKER JE. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10306–10311.
- [2] BAKER B, ZAMBRYSKI P, STASKAWICZ B, DINESH-KUMAR SP. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 1997; **276**: 726–733.
- [3] BECKER J, KEMPF R, JEBLICK W, KAUSS H. Induction of competence for elicitation of defense responses in cucumber hypocotyls requires proteasome activity. *Plant J* 2000; **21**: 311–316.
- [4] BOTELLA MA, PARKER JE, FROST LN, BITTNER-EDDY PD, BEYNON JL, DANIELS MJ, HOLUB EB, JONES JD. Three genes of the *Arabidopsis* RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell* 1998; **10**: 1847–1860.
- [5] DEPRÉS C, DELONG C, GLAZE S, LIU E, FOBERT PR. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein interacts with a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 2000; **12**: 279–290.
- [6] DIXON MS, JONES DA, KEDDIE JS, THOMAS CM, HARRISON K, JONES JDG. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 1996; **84**: 451–459.
- [7] DROGE-LASER W, KAISER A, LINDSAY WP et al. Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J* 1997; **16**: 726–738.

- [8] ETIENNE P, PETITOT A-S, HOUOT V, BLEIN J-P, SUTY L. Induction of *tc1 7*, a gene encoding a β -subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 2000; **466**: 213–218.
- [9] FALK A, FEYS BJ, FROST LN, JONES JD, DANIELS MJ, PARKER JE. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 3292–3297.
- [10] FREDERICK RD, THILMONEY RL, SESSA G, MARTIN GB. Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of tomato Pto kinase. *Mol Cell* 1998; **2**: 241–245.
- [11] HERSKOWITZ I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 1995; **80**: 187–197.
- [12] ICHIMURA K, MIZOGUCHI T, IRIE K et al. Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**: 532–543.
- [13] ITO N, SEO S, OHTSUBO N, NAKAGAWA H, OHASHI Y. Involvement of proteasome-ubiquitin system in wound-signaling in tobacco plants. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 355–360.
- [14] KOBE B, DEISENHOFER J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 415–421.
- [15] KOOMAN-GERSMANN M, VOGELANG R, VOSSEN P, et al. Correlation between binding affinity and necrosis-inducing activity of mutant AVR9 peptide elicitors. *Plant Physiol* 1998; **117**: 609–618.
- [16] KUMAR D, KLESSIG DF. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals: nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant-Microbe Interact* 2000; **13**: 347–351.
- [17] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART J-M, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973–983.
- [18] LI X, ZHANG Y, CLARKE JD, LI Y, DONG X. Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNII, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* 1999; **98**: 329–339.
- [19] LIGTERINK W, KROJ T, ZUR NIEDEN U, HIRT H, SCHEEL D. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 1997; **276**: 2054–2057.
- [20] LIU YH, ZHANG SQ, KLESSIG DF. Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase that interacts with SIPK. *Mol Plant-Microbe Interact* 2000; **13**: 118–124.
- [21] O'NEILL LA, GREENE C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 650–657.
- [22] PARKER JE, COLEMAN MJ, SZABO V et al. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell* 1997; **9**: 879–894.
- [23] ROMEIS T, PIEDRAS P, ZHANG S, KLESSIG DF, HIRT H, JONES JDG. Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 1999; **11**: 273–288.
- [24] RUSHTON PJ, SOMSSICHIE. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 311–315.
- [25] RYALS J, WEYMANN K, LAWTON K et al. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I-B. *Plant Cell* 1997; **9**: 425–439.
- [26] 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.
- [27] SEARS C, OLESEN J, RUBIN D, FINLEY D, MANIATIS T. NF- κ B p105 processing via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1998; **273**: 1409–1419.

- [28] SEO S., SANO H, OHASHI Y. Jasmonic acid in wound signal transduction pathway. *Physiol Plant* 1997; **101**: 740–745.
- [29] SUZUKI K, SHINSHI H. Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 1995; **7**: 639–647.
- [30] TANGA X, XIEA M, KIMB YJ, ZHOUA J, KLESSIG DF, MARTINB GB. Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell* 1999; **11**: 15–30.
- [31] TOBIAS CM, OLDROYD GE, CHANG JH, STASKAWICZ BJ. Plant expressing the Pto disease resistance gene confer resistance to recombinant PVX containing the avirulence gene AvrPto. *Plant J* 1999; **17**: 41–50.
- [32] WURGLER-MURPHY SM, SAITO H. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 172–176.
- [33] YANG RB, MARK MR, GRAY A, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolisaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 1998; **395**: 284–288.
- [34] ZHANG S., DU H, KLESSIG DF. Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitors and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 1998; **10**: 435–450.
- [35] ZHOU J, LOH Y-T, BRESSAN RA, MARTIN GB. The tomato gene Pti1 encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the plant hypersensitive response. *Cell* 1996; **83**: 925–935.
- [36] ZHOU J, TANG X, MARTIN GB. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis element of pathogenesis-related genes. *EMBO J* 1997; **16**: 3207–3218.
- [37] ZHU W, YANG B, CHITTOOR JM, JOHNSON LB, WHITE FF. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol Plant Microbe Interact* 1998; **11**: 824–832.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 19.06.2000 r.

Przyjęto: 17.08.2000 r.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3/230, 30-060 Kraków

KWAS ABCYSYNOWY – PERCEPCJA I TRANSDUKCJA SYGNAŁU

ABSCISIC ACID – PERCEPTION AND SIGNAL TRANSDUCTION

Anna JAKUBOWSKA, Stanisław KOWALCZYK

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

Streszczenie: Kwas abscysynowy (ABA) uczestniczy w wielu procesach rozwojowych cyklu życiowego roślin oraz w ich adaptacji do warunków stresowych środowiska. Doskonałym układem modelowym do badania percepcji i transdukcji sygnału ABA są komórki szparkowe. Odpowiedzi komórek szparkowych na ABA sugerują, że percepcja ABA może zachodzić zarówno w plazmolemie, jak i w cytoplazmie, jednak białka receptorowe nie zostały dotychczas poznane. W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w identyfikacji elementów szlaków sygnałowych ABA. W komórkach szparkowych są nimi: Ca^{2+} , cytozolowe pH, inozytolo-1,4,5-trisfosforan, cykliczna ADP-ryboza oraz fosforylacja białek. Wyselekcjonowanie niewrażliwych na ABA mutantów kukurydzy i *Arabidopsis thaliana* umożliwiło poznanie niektórych składników w szlaku sygnałowym odpowiedzialnym za rozwój nasion. W genach indukowanych przez ABA zidentyfikowano konserwowany motyw sekwencji promotorowej będący elementem odpowiedzi na ABA – *ABA-response element* (ABRE) funkcjonujący jako element *cis* w regulacji transkrypcji. Sklonowano regulatorowe białka jądrowe specyficznie łączące się z ABRE. Większość z nich to czynniki transkrypcyjne z rodziny bZIP.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 633–656)

Słowa kluczowe: kwas abscysynowy (ABA), receptor, transdukcja sygnału, ekspresja genów, komórki szparkowe

Summary: Abscisic acid (ABA) is involved in many developmental processes throughout the life cycle of plants, as well as in plant adaptation to environmental stresses. Guard cells are an excellent system for the studying of ABA perception and signal transduction. Studies of the stomatal responses to ABA have provided evidence for both the plasma membrane and in cytoplasm ABA perception sites. However, the receptor proteins have not been identified as yet. Lately, significant progress has been made in the identification of some elements of the ABA signaling pathway in guard cells. So far, Ca^{2+} , cytosolic pH,

*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 6P04C 056 16.

1,4,5-inositol triphosphate, cyclic ADP-ribose and protein phosphorylation have been identified. Genetic studies on ABA-insensitive mutants in maize and *Arabidopsis thaliana* have also led to identification of several components involved in the signaling pathway responsible for regulating of seed development. A *cis*-acting ABA response element (ABRE) was identified as the promoter sequence motif conserved between several ABA-induced genes. The corresponding nuclear regulator proteins that specifically bind to the ABRE have been cloned. Most of them belong to the bZIP protein family of transcription factors. (*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 633–656)

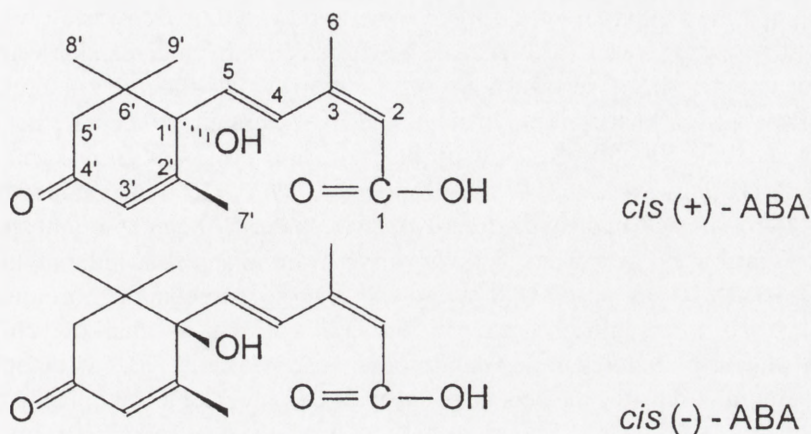
Key words: abscisic acid (ABA), receptor, signal transduction, gene expression, guard cells

WSTĘP

Kwas abscysynowy (ABA) zidentyfikowany w latach sześćdziesiątych jako substancja hamująca wzrost jest jednym z pięciu klasycznych fitohormonów uczestniczących w regulacji wzrostu i rozwoju roślin wyższych. Swoje funkcje biologiczne spełnia kontrolując rozwój i kiełkowanie nasion oraz pośrednicząc w adaptacji roślin do warunków środowiskowych [27,43,68]. W nasionach ABA reguluje akumulację białek zapasowych i lipidów, indukuje stan spoczynkowy nasion i zapobiega ich przedwczesnemu dojrzewaniu, a w tkankach wegetatywnych uczestniczy w regulacji procesów związanych z odpowiedzią roślin na abiotyczne czynniki stresowe, takie jak: susza, zasolenie czy niska temperatura. Biosynteza i metabolizm kwasu abscysynowego oraz jego efekty fizjologiczne są stosunkowo dobrze poznane, natomiast pierwotny mechanizm działania ABA nie jest wyjaśniony i stanowi przedmiot intensywnych badań. W ostatniej dekadzie dokonano znacznego postępu, szczególnie w zakresie identyfikacji poszczególnych elementów szlaku sygnałowego ABA. Omówienie wyników tych badań można znaleźć w wielu pracach o charakterze przeglądowym [16,25,27,31,47,58,62,69]. W polskim piśmiennictwie, w nielicznych publikacjach na temat molekularnych mechanizmów działania hormonów roślinnych stosunkowo mało uwagi poświęca się ABA [6,54,59]. Prezentowana praca, kolejna w cyklu poświęconym temu zagadnieniu [48,49,94], stanowi przegląd kluczowych dokonań w zakresie poznania percepcji i transdukcji sygnału kwasu abscysynowego.

BIAŁKA WIĄŻĄCE A RECEPTORY ABA

ABA wywołuje w komórkach roślinnych dwa rodzaje odpowiedzi: szybkie zmiany w przepuszczalności błon komórkowych związane z aktywnością kanałów jonowych, charakterystyczne dla regulacji ruchów szparek [13,65] oraz odpowiedzi odległe w czasie, związane ze zmianą ekspresji genów na poziomie transkrypcji [15,68]. Obydwa rodzaje odpowiedzi hormonalnej są inicjowane wiązaniem kwasu abscysynowego przez receptory. Identyfikacja białka receptorowego dla ABA nie jest łatwa, podobnie jak w przypadku innych fitohormonów. Zróżnicowane odpowiedzi na hormon są selektywnie indukowane przez różne formy izomeryczne kwasu abs-



RYSUNEK 1. Formy izomeryczne ABA

cysynowego (rys. 1). Szybkie zmiany w przepuszczalności błon plazmatycznych są odpowiedzią głównie na naturalnie występujący enancjomer (+)-ABA, natomiast efekty związane z modyfikacją ekspresji genów, np. hamowanie kiełkowania nasion czy gromadzenie substancji zapasowych w nasionach, mogą być wywoływane w jednakowym stopniu przez (+)-ABA i syntetyczny (-)-ABA [25]. Poszukiwania białek wiążących ABA są utrudnione także z innego względu. Kwas abscysynowy, podobnie jak kwas indolilo-3-octowy (IAA) i gibereliny (GA), jest słabym kwasem ($pK = 4,7$) i w pH, które sprzyja cofaniu dysocjacji grupy karboksylowej występuje w formie elektrycznie obojętnej (ABAH) zdolnej do przenikania przez plazmolemę. Sugeruje to możliwość występowania zarówno receptorów błonowych, jak i receptorów zlokalizowanych wewnątrz komórki.

Do badania lokalizacji miejsc(a) wiązania ABA i transdukcji sygnału hormonalnego wykorzystuje się powszechnie dwa układy modelowe: aparaty szparkowe, najczęściej z liści bobu (*Vicia faba*) i komeliny (*Commelina communis*) oraz komórki aleuronowe ziaren zbóż. Pierwsze wyniki badań sugerowały zewnątrzkomórkową lokalizację miejsc wiążących, ponieważ stwierdzono wysyceniowy charakter wiązania ABA do frakcji błon plazmatycznych izolowanych z liści *V. faba* [37]. Rezultaty dalszych poszukiwań potwierdziły wiązanie ABA do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej [34,38], jednak białek wiążących hormon, jak dotąd, nie udało się zidentyfikować.

W ostatnich latach uzyskano nowe dane sugerujące, że ABA może być wiązany przez receptory wewnątrzkomórkowe. Allan i wsp. [2] obserwowali zamykanie aparatów szparkowych w doświadczeniach, w których metodą mikroiniekcji wprowadzano bezpośrednio do cytoplazmy pojedynczych komórek szparkowych fotolabilną pochodną estrową ABA, 1-(2-nitro) fenyloetylo-ABA (2-NPE-ABA). Fotolityczne uwolnienie ABA pod wpływem promieniowania UV indukowało za-

mykanie aparatów szparkowych. Obserwacje te potwierdzili Schwartz i wsp. [82], natomiast Anderson i wsp. [4] wykazali, że w zastosowanych przez nich warunkach doświadczalnych obecność kwasu absycynowego w cytoplazmie komórek szparkowych nie jest wystarczająca do hamowania otwierania szparek *C. communis*. ABA w stężeniu 50–200 μM , podany bezpośrednio do cytoplazmy komórek zamkniętych aparatów szparkowych nie zapobiegał ich otwieraniu w odpowiedzi na światło. W równoległym doświadczeniu skrawki epidermy z zamkniętymi aparatami szparkowymi były inkubowane w tych samych warunkach naświetlania, ale z dodatkiem 10 μM ABA w pH 8,0, które nie sprzyja przenikaniu hormonu przez plazmolemę. Autorzy nie obserwowali otwierania aparatów szparkowych, co ich zdaniem stawia pod znakiem zapytania możliwość wiązania ABA w cytoplazmie, a tym samym wskazuje na obecność receptora (?) w błonie cytoplazmatycznej. Jak pogodzić ze sobą tak sprzeczne rezultaty? Czy mogą one wynikać z różnorodności materiału roślinnego wykorzystywanego w badaniach (*V. faba* i *C. communis*) lub stosowanych metod i warunków doświadczeń? Niewykluczone, że odmienne wyniki odzwierciedlają różnorodność odpowiedzi komórek szparkowych na ABA. Kwas absycynowy może bowiem wpływać na transport jonów w tych komórkach poprzez: hamowanie kanałów transportujących K^+ do komórki, aktywację kanałów transportujących K^+ z komórki, otwieranie kanałów wapniowych, a także depolaryzację błony [12]. Ponadto, należy pamiętać, że indukcja zamykania i hamowanie otwierania aparatów szparkowych są odrębnymi procesami [12] i nie można wykluczyć, że każdy z nich jest inicjowany związaniem hormonu w innym przedziale komórkowym.

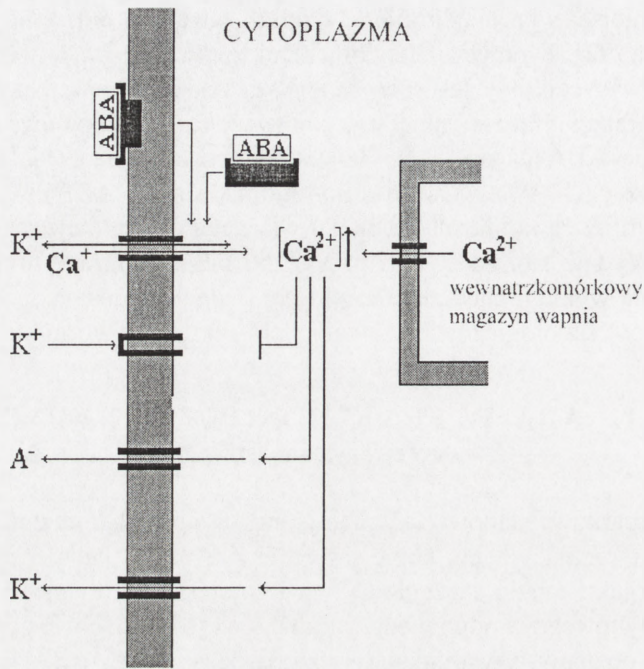
Jednoznacznych rozstrzygnięć odnośnie lokalizacji miejsc(a) wiązania ABA nie przyniosły także badania mechanizmu percepcji hormonu w komórkach aleuronowych ziarniaków zbóż [9,62]. Rezultaty doświadczeń, w których obserwowano wpływ ABA na ekspresję niektórych genów w protoplastach komórek aleuronowych jęczmienia, wskazują, że podobnie jak w komórkach szparkowych możliwe jest występowanie odrębnych miejsc wiązania ABA w plazmolemie i cytoplazmie, związane z indukowaniem różnych odpowiedzi na hormon [23].

Ostatnio pojawiły się doniesienia dotyczące percepcji ABA w nie badanych do tej pory gatunkach roślin. W kulturach komórkowych rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) obserwowano dwa fizjologiczne efekty wywołane przez ABA: wczesną odpowiedź w postaci depolaryzacji błony komórkowej, po której następował wypływ K^+ z cytoplazmy oraz opóźnioną w czasie akumulację transkrypty genu *Rab18*, specyficznie indukowanego w roślinach poddanych działaniu niskiej temperatury lub stresowi wodnemu [40]. Obydwie odpowiedzi następowały po inkubacji komórek w środowisku zawierającym nie przenikający przez plazmolemę koniugat ABA-BSA, co sugeruje, że miejsce wiązania ABA jest zlokalizowane w błonie komórkowej. Białkowa natura tego miejsca została potwierdzona we wcześniejszych eksperymentach tych samych autorów. Kolejne doświadczenia dostarczają jednak dowodów na wewnątrzkomórkowe wiązanie ABA, bowiem stosując ^3H -ABA zidentyfikowano

specyficzne miejsca wiązania hormonu w mikrosomach z komórek mezokarpu owoców winogron [92]. Typowe analizy biochemiczne wykazały, że wiązanie $^3\text{H-ABA}$ ma charakter wysyceniowy, jest specyficzne i zachodzi z wysokim powinowactwem. Traktowanie frakcji mikrosomalnej trypsyną powodowało stopniowe obniżanie zdolności wiązania ABA aż do całkowitej utraty, potwierdzając białkowy charakter miejsc(a) wiążących. W obecności ditiotretolu wiązanie ABA było hamowane w 90%, co sugeruje, że konformacja białka wiążącego warunkuje jego funkcjonalną aktywność. Wydaje się, że w tym przypadku białko wiążące hormon w dużym stopniu spełnia wymogi stawiane receptorom, jednak w doświadczeniach tych nie badano efektów fizjologicznych wywołanych wiązaniem hormonu.

UDZIAŁ ABA W FUNKCJONOWANIU APARATÓW SZPARKOWYCH

Aparaty szparkowe stanowią wygodny i atrakcyjny układ modelowy do badania mechanizmów regulacyjnych, ponieważ odpowiadają na wiele różnorodnych sygnałów, takich jak: światło, stężenie CO_2 , wilgotność czy fitohormony [45]. Udział kwasu abscysynowego w odpowiedziach roślin na środowiskowe czynniki stresowe jest najlepiej poznany w warunkach suszy, podczas której ABA jest szybko syntetyzowany i gromadzony w tkankach liści. Podwyższony poziom hormonu indukuje zamykanie szparek, co pozwala ograniczyć utratę wody w procesie transpiracji. Zamykanie szparek jest wynikiem obniżenia poziomu składników osmotycznie czynnych na skutek wypływu z komórek szparkowych jonów K^+ , Cl^- i składników organicznych oraz związanego z tym spadku turgoru tych komórek [13]. Precyzyjne mechanizmy regulacji i integracji transportu błonowego wciąż nie są szczegółowo poznane, ale wiadomo, że w przepływie jonów w obu kierunkach pośredniczą kanały jonowe, których aktywność jest regulowana przez ABA [12,90]. Badania elektrofizjologiczne prowadzone w całych komórkach szparkowych lub metodą *patch-clamp* na fragmentach plazmolemy i tonoplastu umożliwiły identyfikację występujących w nich kanałów jonowych [90]. Doświadczenia, w których mierzono przepływ jonów w izolowanych komórkach szparkowych oraz stosowano inhibitory kanałów anionowych, sugerują, że kluczowym mechanizmem regulującym funkcjonowanie aparatów szparkowych jest hormonalna aktywacja wolnych kanałów anionowych (typ S – ang. *slow*) [81]. Otwieranie kanałów typu S i wypływ anionów z cytoplazmy komórek szparkowych wywołuje przedłużoną w czasie (kilkuminutową) depolaryzację błony cytoplazmatycznej, której następstwem jest aktywacja kanałów potasowych transportujących K^+ na zewnątrz komórki. Wpływ anionów i jonów potasowych powoduje spadek turgoru i objętości komórek szparkowych, a w konsekwencji zamykanie aparatów szparkowych (rys. 2).



RYSUNEK 2. Uproszczona sekwencja zdarzeń występujących w błonie cytoplazmatycznej komórek szparkowych w odpowiedzi na ABA. Wiązanie ABA do receptora (a) aktywuje nieselektywne kanały jonowe (b). Wnikanie Ca^{2+} poprzez kanały oraz uwalnianie Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych powoduje wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie (c). Podwyższony poziom Ca^{2+} hamuje aktywność kanałów transportujących K^+ do wnętrza komórki (d) oraz aktywuje kanały anionowe typu S (e) i kanały transportujące K^+ na zewnątrz komórki (f) (na podstawie danych [10,90])

W komórkach szparkowych jedną z najwcześniejszych odpowiedzi na ABA jest wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu [10,30,65]. Przypuszcza się, że jest to spowodowane napływem Ca^{2+} poprzez kanały wapniowe z apoplastu oraz uwalnianiem wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych (wakuola, siateczka śródplazmatyczna) przy udziale inozytolo-1,4,5-trisfosforanu i/lub cyklicznej ADP-rybozy [3,13,65]. Wzrost stężenia wapnia aktywuje, podobnie jak ABA, kanały anionowe typu S oraz hamuje kanały transportujące K^+ do komórki, których aktywność jest niezbędna do otwierania aparatów szparkowych [81]. Wydaje się więc, że indukowane przez ABA zamykanie szparek może być związane ze wzrostem stężenia Ca^{2+} , jednakże fizjologiczna rola wapnia w zamykaniu szparek w odpowiedzi na ABA nie została ostatecznie rozstrzygnięta. Rezultaty niektórych badań nie potwierdzają bezpośredniej korelacji między wzrostem poziomu Ca^{2+} a ruchem szparek, ponieważ część szparek zmyka się w odpowiedzi na ABA bez mierzalnych zmian w stężeniu wapnia [10,13]. Niewykluczone, że w niektórych przypadkach zmiany występują tylko w pobliżu błony plazmatycznej w bezpośrednim sąsiedztwie wrażliwych na wapń kanałów

jonowych. Istnieją też dowody eksperymentalne wskazujące na udział czynników środowiskowych wpływających na poziom Ca^{2+} , np. temperatury [2]. W doświadczeniach, w których obserwowano odpowiedzi komórek szparkowych *C. communis* na ABA uzyskano wyniki sugerujące, że w zależności od temperatury percepcja ABA w komórkach szparkowych może prowadzić do zamykania aparatów szparkowych dwiema drogami: zależnej i niezależnej od Ca^{2+} . Biorąc pod uwagę udział Ca^{2+} w różnorodnych szlakach sygnałowych funkcjonujących w komórkach szparkowych ustalenie jego roli w odpowiedzi na ABA nie jest łatwe. Podstawowe pytanie, jakie nasuwa się w tej sytuacji, dotyczy sposobu „kodowania” specyficzności informacji w postaci zmian stężenia Ca^{2+} , jeśli jest ona identyczna w przekazywaniu rozmaitych sygnałów. Być może jony wapnia stanowią element wspólny w miejscu rozgałęzienia szlaków, a właściwy kierunek odpowiedzi na określony sygnał zależy od działania innych elementów w szlaku przekazywania danego sygnału. Jest to problem niezwykle interesujący, coraz częściej dyskutowany na łamach publikowanych ostatnio prac, w których rozważa się istnienie i możliwą rolę elementów wspólnych i tzw. *cross-talk* między różnymi szlakami sygnałowymi funkcjonującymi w komórkach roślinnych [51,71,91].

Wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu, charakterystyczny dla wczesnych odpowiedzi na ABA, sugeruje możliwość funkcjonowania w szlaku sygnałowym inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (InzP_3) jako wtórnego przekaźnika uczestniczącego w uwalnianiu Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych, takich jak: wakuola i siateczka śródplazmatyczna. Badania elektrofizjologiczne z zastosowaniem techniki *patch-clamp* wykazały, że Ca^{2+} może napływać z wakuoli do cytoplazmy przez specyficzne kanały bramkowane przez InzP_3 [11,24]. Biorąc dodatkowo pod uwagę ostatnie doniesienie o udziale fosfolipazy C w indukowanych przez ABA oscylacjach poziomu Ca^{2+} w komórkach szparkowych *C. communis* [88], nie można wykluczyć możliwości, że elementy szlaku fosfoinozytoloowego stanowią integralną część odpowiedzi na ABA.

Od pewnego czasu wiadomo, że mobilizacja wapnia w cytozolu poprzez uwalnianie go z przedziałów subkomórkowych może zachodzić nie tylko z udziałem InzP_3 , ale także cyklicznej ADP-rybozy (cADPR) [33,93]. Obecność wrażliwych na cADPR endogennych magazynów wapnia stwierdzono w różnych typach komórek zwierzęcych, ludzkich, a także roślinnych [52]. W komórkach zwierzęcych, stosując specyficzne inhibitory ustalono z całą pewnością, że uwalnianie Ca^{2+} z udziałem cADPR nie zależy od szlaku, w którym pośredniczy InzP_3 i zachodzi najprawdopodobniej poprzez aktywację receptorów rianodinowych [33]. Mechanizm działania cADPR w komórkach roślinnych nie jest dokładnie poznany. Badania prowadzone w ostatnich latach zmierzają do identyfikacji białek wrażliwych na cADPR. Uzyskane dotąd rezultaty wykazują obecność cADPR w komórkach roślinnych oraz jej udział w uwalnianiu wapnia z wakuoli w szlaku przypominającym ten, który funkcjonuje w komórkach zwierzęcych [3,73]. Możliwość udziału cADPR w przekazywaniu

sygnału ABA została wykazana w doświadczeniach, w których po wprowadzeniu metodą mikroiniekcji cADPR do cytoplazmy komórek szparkowych *C. communis* obserwowano spadek ich turgoru poprzedzony wzrostem stężenia cytozolowego Ca^{2+} uwalnianego z wakuoli. Zastosowanie 8-NH₂-cADPR, antagonisty cADPR, wyraźnie hamuje zmniejszanie turgoru wywoływane przez ABA [50].

W poszukiwaniach istotnych elementów mechanizmu zamykania aparatów szparkowych indukowanego przez ABA zwrócono także uwagę na białka G. Znany jest udział białek G w regulacji kanałów jonowych przez sygnały zewnątrzkomórkowe u zwierząt [14]. Mimo niezbyt licznych dowodów sądzi się, że białka G uczestniczą także w szlakach sygnałowych u roślin, np. nie ma wątpliwości co do udziału tych białek w transdukcji takiego sygnału jak gibereliny [49]. Prawdopodobnie białka G mogą pośredniczyć też w niektórych odpowiedziach komórek roślinnych na kwas abscysynowy, ponieważ stwierdzono, że ABA indukuje hydrolizę GTP w błonach plazmatycznych z koleoptyli kukurydzy [39]. Jednakże ich działanie w przekazywaniu sygnału ABA nie jest, jak dotąd, zrozumiałe. Badania wpływu białek G na funkcjonowanie aparatów szparkowych w komórkach *V. faba* [18] i *C. communis* [53] w obecności GDPβS, GTPγS (analogów GDP i GTP) oraz toksyny krztuśca dostarczyły sprzecznych wyników, ponieważ aktywacja białek G indukowała odpowiednio zamykanie bądź otwieranie szparek. Sugeruje się, że w regulacji aktywności kanałów jonowych, od której zależy turgor komórek szparkowych, uczestniczą różne typy białek G, które być może oddziałują z różnymi białkami efektorowymi, podobnie jak ma to miejsce w szlakach sygnałowych u zwierząt. Jeden typ białka G mógłby aktywować fosfolipazę C, natomiast inny rodzaj białka G aktywowałby cyklazę adenylnową i syntezę cAMP. Możliwość uczestniczenia cAMP w regulacji funkcjonowania aparatów szparkowych pod wpływem ABA, w szlaku zależnym od Ca^{2+} przedstawili ostatnio Jin i Wu [41]. Z ich badań wynika, że cAMP odwraca efekt zamykania aparatów szparkowych indukowany przez Ca^{2+} lub ABA, prawdopodobnie przez zniesienie hamowania aktywności kanałów transportujących K^+ do komórki.

W badaniach szlaku przekazywania sygnału ABA, szczególnie w ustalaniu molekularnego mechanizmu modulowania aktywności kanałów jonowych z udziałem przedstawionych wyżej pośredników, wiele uwagi poświęca się roli kinaz i fosfataz białkowych. Jak wiadomo, odwracalna fosforylacja białek jest uniwersalnym mechanizmem funkcjonującym w szlakach sygnałowych. Na podstawie danych uzyskanych w doświadczeniach z zastosowaniem inhibitorów kinaz i fosfataz białkowych stwierdzono, że w drodze fosforylacji i defosforylacji regulowane są wolne kanały anionowe w komórkach szparkowych *V. faba* [80], kanały jonowe *A. thaliana* [78], kanały potasowe i chlorkowe *V. faba* [63,77], a także niektóre kanały wakuolarne w komórkach aleuronowych jęczmienia [8]. Chociaż wyniki tych badań sugerują, że odwracalna fosforylacja białek jest kluczowym składnikiem szlaku transdukcji sygnału ABA, to identyfikacja zarówno enzymów, jak i białek efektorowych jest

bardzo ograniczona. Ostatnio opublikowano wyniki badań, które doprowadziły do sklonowania cDNA kinazy aktywowanej przez ABA [61]. Enzym, którego aktywność stwierdzono już wcześniej w protoplastach z komórek szparkowych *V. faba* [72], wydaje się być specyficzny dla komórek szparkowych i nie jest zależny od Ca^{2+} . Analiza sekwencji nukleotydowej pozwoliła ustalić, że kodowany przez nią produkt białkowy jest kinazą serynowo/treoninową, AAPK (*ABA* – *activated protein kinase*). Ekspresja zmutowanej sekwencji cDNA (zamiana Lys^{43} na Ala^{43}) w transformowanych komórkach szparkowych *V. faba* hamowała indukowane przez ABA zamykanie szparek na skutek zniesienia aktywacji kanałów jonowych.

Wzrost poziomu Ca^{2+} w odpowiedziach na ABA sugeruje możliwość przekazywania sygnału hormonalnego za pośrednictwem kinaz zależnych od Ca^{2+} (CDPK). Potwierdziły to wyniki badań prowadzonych na protoplastach z komórek mezofilowych kukurydzy, w których zidentyfikowano dwie kinazy zależne od jonów wapnia uczestniczące w regulacji ekspresji genów pod wpływem czynników stresowych środowiska [83]. Pei i wsp. [77] wykazali, że zrekombinowane białko CDPK *A. thaliana* oczyszczone z *E. coli* aktywowało tonoplastowy kanał Cl^- w izolowanych wakuolach z komórek szparkowych *V. faba*. W komórkach szparkowych *V. faba* zidentyfikowano także CDPK, która fosforyluje białko KAT1 będące przypuszczalnie kanałem potasowym transportującym K^+ do komórki [60].

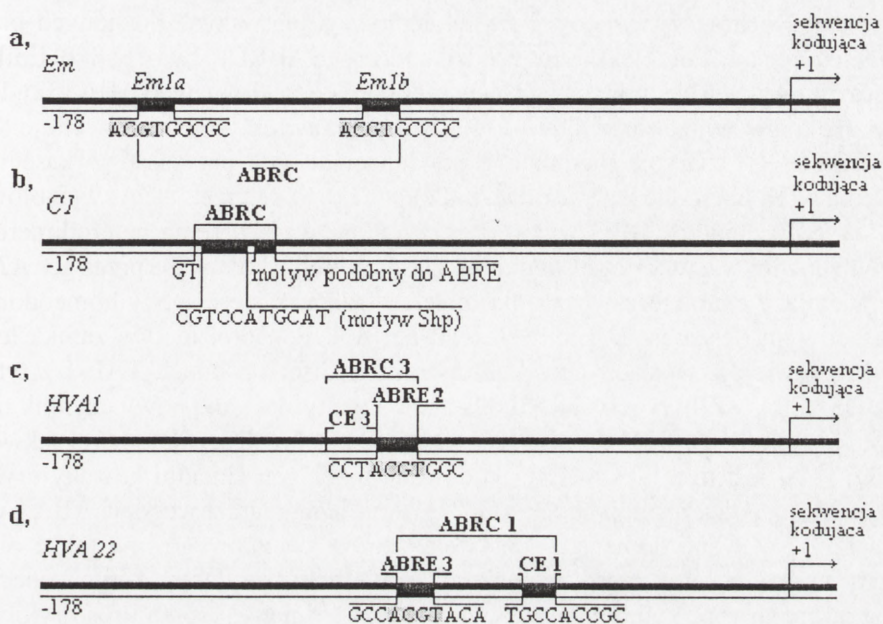
Badania genetyczne oraz analizy biochemiczne z zastosowaniem specyficznych inhibitorów wykazały, że w regulacji aktywności kanałów jonowych w komórkach szparkowych uczestniczą fosfatazy należące do trzech typów: PP1 i PP2A niezależne od Ca^{2+} , hamowane przez kwas okadejowy i kalikulinę A, PP2B zależne od Ca^{2+} /kalmoduliny, hamowane przez cyklosporynę A oraz PP2C zależne od Mg^{2+} [64,65]. Kwas okadejowy i kalikulina A blokują w komórkach szparkowych kanały transportujące K^+ do komórki [64]. Kwas okadejowy silnie hamuje także aktywność wolnych kanałów anionowych potwierdzając rolę fosfatyz typu PP1 i P2A jako regulatorów negatywnych [78,90]. Aktywne kanały potasowe transportujące K^+ do komórki indukują otwieranie aparatów szparkowych, podczas gdy zamykanie jest związane z aktywnością kanałów anionowych, dlatego sugeruje się, że fosfatazy PP1 i P2A mogą działać jako pozytywne regulatory w otwieraniu i negatywne regulatory w zamykaniu szparek. Znaczenie fosfatyz typu 2B dla modulacji aktywności kanałów jonowych wykazano w doświadczeniach z zastosowaniem cyklosporyny A, która specyficznie blokowała indukowaną wapniem inaktywację kanałów potasowych w komórkach szparkowych *V. faba* [63]. Udział w szlaku transdukcji sygnału ABA fosfatyz typu PP2C sugerują wyniki analizy genetycznej mutantów *abi* rzodkiewnika niewrażliwych na ABA (*ABA* - *insensitive*) [56,57,70]. Dwa loci, *ABI1* i *ABI2* kodują wysoko homologiczne białka wykazujące aktywność fosfatyz PP2C zależnej od Mg^{2+} i niewrażliwej na kwas okadejowy [55,79]. W doświadczeniach z zastosowaniem inhibitorów kinaz białkowych wykazano, że białko ABI1

jest elementem mechanizmu odwracalnej fosforylacji, który w komórkach szparkowych moduluje wrażliwość kanałów potasowych na kwas absycynowy [5].

UDZIAŁ ABA W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Większość efektów biologicznych wywołanych działaniem ABA, zarówno w nasionach jak i tkankach wegetatywnych, jest związana ze zmianą ekspresji genów [15,68,87]. Geny znajdujące się pod kontrolą ABA zidentyfikowano u wielu gatunków roślin, a ich analiza molekularna umożliwiła w niektórych przypadkach ustalenie funkcji kodowanych przez nie białek oraz identyfikację sekwencji promotorowych odpowiadających na sygnał hormonalny, elementów *cis* będących końcowymi składnikami szlaku sygnału absycynowego. Poznano także niektóre z białek regulatorowych wiążących się z tymi sekwencjami. Obecnie wiadomo, że kwas absycynowy indukuje ekspresję ponad 150 genów różnych gatunków roślin, w większości przypadków w późnych etapach rozwoju nasion oraz w tkankach wegetatywnych roślin poddanych działaniu czynników stresowych środowiska [16,27,68,87]. Najwięcej danych dotyczących wpływu ABA na regulację transkrypcji dostarczają badania nad genetyczną kontrolą i integracją procesów związanych z dojrzewaniem i kiełkowaniem nasion.

Analiza sekwencji promotorowych genów indukowanych przez ABA, takich jak: *Em* z pszenicy [66], *Osem* i *Rab16B* z ryżu [35,76], *HVA1*, *HVA22* [85,86], *Cl* z kukurydzy [44], wykazała, że dla transkrypcji indukowanej przez ABA konieczna jest obecność konserwowanej sekwencji określanej jako ABRE (*ABA* – *response element*). Obecnie znanych jest ponad 20 sekwencji promotorowych ABRE, które stanowią fragment 8–10 par zasad zawierający wspólną sekwencję ACGT. Interesujące jest, że motyw ACGT jest charakterystyczny także dla podobnych sekwencji określanych jako kasety G, obecnych w licznych promotorach u drożdży oraz w genach roślinnych indukowanych przez inne czynniki, takie jak: światło, auksyny, kwas jasmonowy, kwas salicylowy [87]. W związku z tym nasuwają się wątpliwości, czy sekwencja ACGT może zapewnić specyficzność odpowiedzi na ABA. Wykazano, że dla prawidłowej odpowiedzi niezbędne są dodatkowe elementy, które razem z sekwencją ABRE tworzą tzw. kompleks odpowiedzi na ABA – ABRC (*ABA* – *response complex*) [58] (rys. 3). ABRC w promotorze genu *Em* z pszenicy obejmuje podwójną kasetę G pochodzącą z dwóch odrębnych elementów: *Em1a* i *Em1b*, z których każdy zawiera sekwencję ACGT [66] (rys.3a). Innym przykładem jest ABRC w genie *Rab16* z ryżu, w którym występuje tzw. Motyw I z kasetą G oraz Motyw II stanowiący element *cis* inny niż kasety G, ale istotny dla odpowiedzi na ABA [76]. Z kolei w promotorze genu *Cl* (*Colourless-1*) z kukurydzy, uczestniczącym w biosyntezie antocyjanów w nasionach zidentyfikowano ABRC zawierający motyw podobny do ABRE, który sam nie jest istotny dla odpowiedzi na ABA, ponieważ kluczową rolę w indukcji promotora odgrywa oddzielna sekwencja



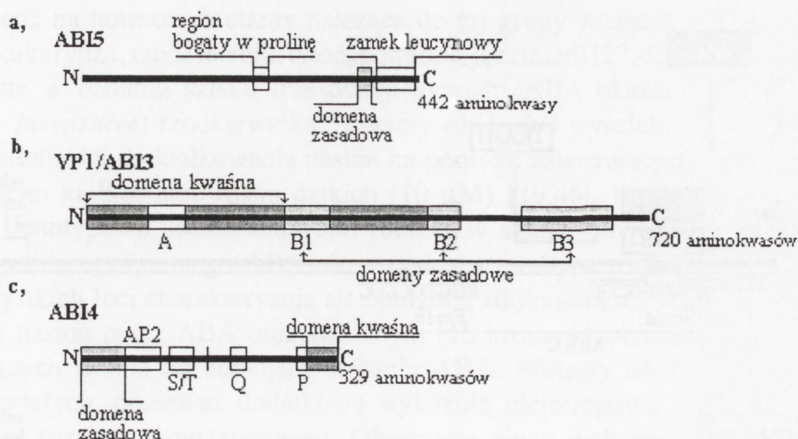
RYSUNEK 3. Sekwencje regulatorowe w promotorach genów indukowanych przez ABA: a) kompleks odpowiedzi na ABA (ABRC) genu *Em* z pszenicy obejmuje podwójną kasę G pochodzącą z dwóch odrębnych elementów *Em1a* i *Em1b*, z których każdy zawiera sekwencje ACGT; b) ABRC genu *Cl* z kukurydzy zawiera motyw podobny do ABRE oraz motyw Shp. W promotorach genów *HVA1* i *HVA22* z jęczmienia ABRC składa się z kasety G i dodatkowych fragmentów, tzw. elementów sprzęgających (CE): c) ABRC3 w promotorze genu *HVA1* obejmuje sekwencję ABRE2 oraz fragment CE3 występujący powyżej tej sekwencji; d) ABRC1 w promotorze genu *HVA22* obejmuje sekwencję ABRE3 i położony od niej w dół fragment CE1 (na podstawie danych [44,66,85,86])

określana jako motyw Shp [44] (rys.3b). W promotorach genów *HVA1* i *HVA22* z jęczmienia dla specyficznej odpowiedzi na ABA oprócz kasety G niezbędna jest obecność dodatkowych krótkich fragmentów określanych jako elementy sprzęgające CE (*coupling element*) [85,86] (rys.3c,d).

Poznanie sekwencji promotorowych genów indukowanych przez ABA umożliwiło poszukiwanie białek regulatorowych rozpoznających specyficzną sekwencję stanowiącą kompleks odpowiedzi na kwas abscysynowy. Obecnie prowadzone są badania pozwalające określić naturę czynników transkrypcyjnych pośredniczących w regulacji ekspresji genów w nasionach poprzez różne, wspomniane wyżej elementy *cis*. Nie są one proste, ponieważ homologia sekwencji ABRE z elementami charakterystycznymi dla odpowiedzi na inne sygnały jest przeszkodą w ustaleniu, które białko wiąże się specyficznie z ABRE *in vivo*. Większość regulatorów transkrypcji rozpoznających sekwencję ABRE stanowią białka z rodziny bZIP [16]. Czynniki transkrypcyjne należące do tej rodziny charakteryzują się obecnością konserwo-

wanych regionów zasadowych bogatych w leucynę (motyw zamka leucynowego) i występują u drożdży, ssaków i roślin. Jednym z pierwszych poznanych białek, które rozpoznaje kompleks odpowiedzi na ABA (ABRC), było białko EmBP-1 zidentyfikowane w ekstraktach jądrowych z pszenicy traktowanych ABA [32]. Ustalono, że jego wiązanie z DNA w regionie zawierającym sekwencję 8 pz (CACGTGGC) staje się niemożliwe po mutacji dwóch par zasad w kasecie G. Rodzina bZIP obejmuje również dwa białka indukowane przez ABA, wyizolowane z *A. thaliana*: białko GBF3 wykazujące zdolność do tworzenia heterodimerów o różnym powinowactwie do sekwencji ACGT oraz białko kodowane przez gen *ATHB-7* zawierające charakterystyczną dla białek wiążących się z DNA homeodomenę z zasadowym obszarem bogatym w leucynę [87]. Ponadto, motyw zamka leucynowego zawierają wiążące się z konserwowaną kasetą G białka TAF-1 z tytoniu oraz OSBZ8 i osZIP-1a z ryżu [58]. Ostatnio zidentyfikowano nowy czynnik transkrypcyjny z rodziny bZIP uczestniczący w *trans*-aktywacji regulatorowej sekwencji ABRE [22]. Jest nim białko ABI5 kodowane przez gen zidentyfikowany u wyselekcjonowanego wcześniej mutantu *abi5* *A. thaliana* niewrażliwego na ABA. ABI5, poza konserwowaną domeną z motywem zamka leucynowego, ma także obszar bogaty w prolinę oraz sześć potencjalnych miejsc fosforylacji, których obecność sugeruje możliwość zmian jego aktywności przez zmiany stopnia ufosforylowania (rys. 4a).

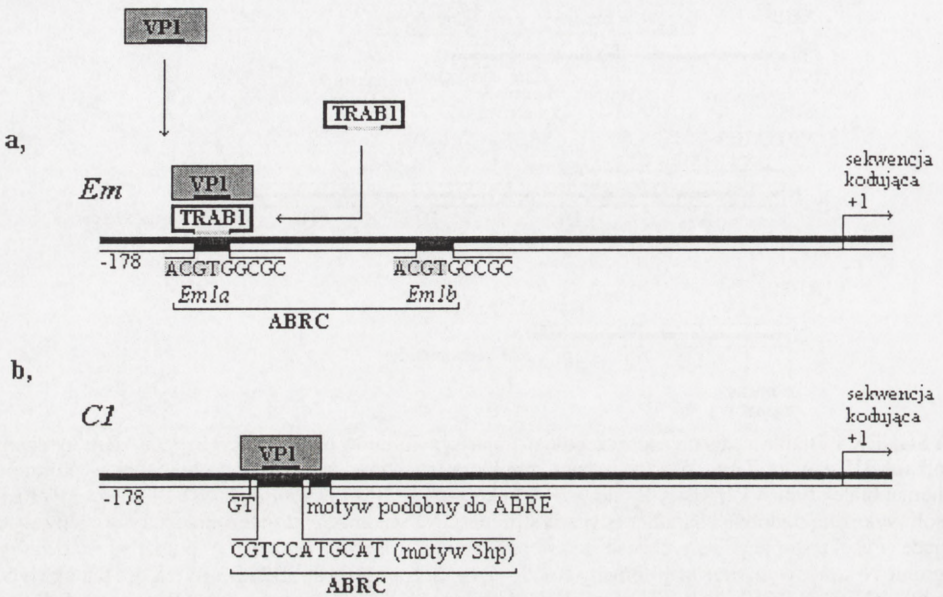
Badania mutantów niewrażliwych na ABA, *viviparous-1* (*vp1*) kukurydzy oraz *abi3* *A. thaliana* przyczyniły się do poznania innej klasy białek uczestniczących w regulacji ekspresji genów pod wpływem ABA. Na podstawie analizy molekularnej białek VP1 i ABI3 przypuszcza się, że mogą być one wymagane do transkrypcji genów uczestniczących w dojrzewaniu zarodków kukurydzy i *A. thaliana*, indukowanym przez ABA [26,67]. Białka homologiczne do VP1 i ABI3 wyizolowano także z innych roślin, takich jak: ryż, fasola, owies [58]. Identyfikacja wysoko konserwowanych homologów w odległych ewolucyjnie gatunkach roślin w połączeniu z obserwowanym podobieństwem fenotypów mutantów wskazuje, że geny te pełnią zasadniczą funkcję w regulacji stanu spoczynkowego nasion, dojrzewania zarodka i kiełkowania nasion. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasów homologicznych białek VP1/ABI3 ustalono, że zawierają one podobnie rozmieszczone domeny, wśród których charakterystyczna jest konserwowana kwaśna domena N-końcowa z wysoką zawartością seryny i treoniny oraz trzy domeny zasadowe (rys.4b). Wykazano, że dla funkcji tych białek jako aktywatorów transkrypcji istotny jest fragment zawierający 121 reszt aminokwasowych znajdujący się w kwaśnej domenie N-końcowej [67]. Mimo że uzyskane wyniki badań wyraźnie wskazują, że VP1 i ABI3 funkcjonują jako aktywatory transkrypcji, do dziś niewiele jest dowodów na to, że wiążą się one bezpośrednio z DNA. Jaki jest więc mechanizm aktywacji transkrypcji za pośrednictwem elementów ABRE z udziałem VP1/ABI3? Proponuje się, że VP1 jest koaktywatorem białkowym, który aktywuje pośrednio promotorowe



RYSUNEK 4. Białka uczestniczące w regulacji transkrypcji genów indukowanych przez ABA: a) schemat białka ABI5 z *A. thaliana* z zaznaczonym zamkiem leucynowym i regionem bogatym w prolinę; b) schemat białek typu VP1/ABI3. Białka VP1 z kukurydzy, ABI3 z *A. thaliana*, OsVP1 z ryżu i PvALF z fasoli wykazują podobną charakterystyczną strukturę. Na schemacie zaznaczono cztery domeny wykazujące wysoki stopień identyczności sekwencji aminokwasowej: domenę A położoną w kwaśnym regionie N-końcowym oraz trzy domeny zasadowe oznaczone jako B1, B2 i B3. Wielkość białek wynosi od 691 (VP1) do 752 (PvALF) reszt aminokwasowych; c) schemat białka ABI4 z *A. thaliana* z charakterystyczną domeną APETALA2 (AP2); na schemacie pokazano także N-końcową domenę zasadową, C-końcową domenę kwaśną oraz dwa inne charakterystyczne regiony: bogaty w serynę i treoninę i z wysoką zawartością glutaminy (na podstawie danych [21,22,58])

elementy *cis*, poprzez interakcje typu białko-białko z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Ostatnio zidentyfikowano w tkankach zarodka nasion ryżu nowy aktywator transkrypcji z rodziny bZIP, nazwany TRAB1 (*transcription factor responsible for ABA regulation*), z którym może współdziałać VP1 [36] (rys.5a). Badania wykonane na transgenicznym drożdżach zawierających sklonowaną sekwencję kodującą TRAB1 wykazały, że białko to może wiązać się zarówno z VP1, jak i promotorową sekwencją ABRE pośrednicząc w przekazywaniu sygnału ABA. Z drugiej strony, w badaniach *in vitro* wykazano, że domena B3 białka VP1 może specyficznie wiązać się z tzw. motywem Sph będącym elementem kompleksu ABRC w promotorze genu *C1* kukurydzy [89] (rys.5b).

Innym typem czynnika transkrypcyjnego rozpoznającego specyficzne sekwencje promotorowe genów indukowanych przez ABA okazało się zidentyfikowane niedawno białko ABI4. Po sklonowaniu genu *abi4* u kolejnego mutantu *A. thaliana* niewrażliwego na ABA ustalono, że koduje on białko homologiczne do ABI3 [21]. Jednakże szczegółowa analiza genetyczna wykazała, że ABI4 należy on do innej niż ABI3 klasy regulatorów transkrypcji wyróżniających się posiadaniem tzw. domeny AP2 (APETALA 2), która prawdopodobnie uczestniczy w wiązaniu z DNA (rys.4c). Jest to nowa rodzina białek wiążących się z DNA genów kontrolujących kwitnienie, zidentyfikowana u *A. thaliana* [75]. Domena AP2 zawiera konserwowany



RYSUNEK 5. Mechanizm *trans*-aktywacji VPI w zależności od docelowych elementów *cis*: a) VPI pełni funkcję koaktywatora transkrypcji genu *Em* z pszenicy poprzez interakcje z czynnikiem transkrypcyjnym TRABI, który zawiera motyw zamka leucynowego i specyficznie wiąże się z elementem *Emla* będącym fragmentem sekwencji ABRC w promotorze genu *Em* z pszenicy; b) VPI za pośrednictwem konserwatywnej zasadowej domeny B3 bezpośrednio oddziałuje z motywem Sph w promotorowej sekwencji ABRC genu *C1* z kukurydzy ([36,44,89])

motyw WAAEIRD charakterystyczny dla białek pośredniczących w transdukcji sygnałów hormonalnych bądź wywoływanych stresem. Do rodziny tej należą między innymi EREBPs, białka z tytoniu wiążące się z promotorowymi elementami *cis*, warunkującymi odpowiedź na etylen [74] oraz białko APETALA 2 z *Arabidopsis* kodowane przez gen *APETALA2* kontrolujący kwitnienie i rozwój nasion [42].

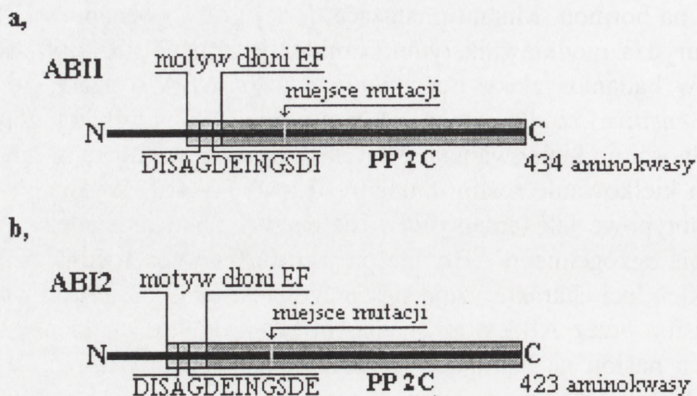
W ekspresji genów będących pod kontrolą ABA mogą uczestniczyć także czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB, co sugerują wyniki badań prowadzonych na tkankach wegetatywnych *A. thaliana* w warunkach stresu wodnego [1].

BIĄŁKA ABI1 i ABI2 ELEMENTAMI SZLAKU TRANSDUKCJI SYGNAŁU ABA

Znaczny postęp w poznawaniu elementów szlaku transdukcji sygnału abscysynowego nastąpił po wyselekcjonowaniu mutantów wykazujących zmienioną

odpowiedź na hormon. Mutanty należące do tej grupy poznano u kilku gatunków roślin (kukurydza, rzodkiewnik, tytoń, pomidor, jęczmień) [27,47,68], ale najbardziej przydatne w badaniu szlaku transdukcji sygnału ABA okazały się mutanty *abi* (*ABA* – *insensitive*) rzodkiewnika. Mutanty *abi1-abi5* wyselekcjonowano na podstawie zdolności do kiełkowania nasion na podłożu zawierającym ABA w stężeniu hamującym kiełkowanie roślin dzikich (10 μM) [19,46]. Wykazują one podobne zmiany fenotypowe jak mutanty *aba* (defekt w szlaku biosyntezy ABA), jednak zastosowanie egzogenego ABA nie przywraca fenotypu rośliny dzikiej. Mutacje we wszystkich loci charakteryzują się obniżoną zdolnością indukcji stanu spoczynkowego nasion przez ABA oraz znacznym (10-krotnym) obniżeniem wrażliwości kiełkujących nasion na hamujące stężenia ABA. Mutanty *abi1* i *abi2* różnią się od pozostałych, ponieważ dodatkowo wykazują plejotropowe zmiany fenotypów na etapie rozwoju wegetatywnego. Obserwuje się u nich niewrażliwość na ABA wzrost korzeni oraz nadmierną transpirację i skłonność do usychania, co jest wywołane defektem w mechanizmie regulacji szparek [20]. Ta ostatnia, najbardziej dramatyczna zmiana fenotypowa mutantów *abi* objawia się tym, że aparaty szparkowe pozostają wciąż otwarte, nawet w obecności ABA, powodując szybkie usychanie rośliny. Efekt ten wyraźnie wskazuje na uszkodzenie szlaku prowadzącego do regulacji kanałów jonowych w komórkach szparkowych. Sugestie te zostały potwierdzone w badaniach ekspresji *abi1-1* w transgenicznym tytoniu *Nicotiana benthamiana*, w których wykazano, że w komórkach szparkowych transformowanego tytoniu kanały transportujące K^+ w obu kierunkach stają się niewrażliwe na ABA, przy czym aktywność kanałów anionowych pozostawała bez zmian [5,29]. Mutanty *abi3*, *abi4*, *abi5* wykazują zmiany fenotypowe tylko na etapie rozwoju nasion, ale charakteryzują się dodatkowymi cechami, które nie występują u *abi1* i *abi2*, takimi jak: degradacja chlorofilu, tolerancja suszy oraz obniżenie zawartości zapasowych białek, lipidów i produktów genów *lea* (*late-embryogenesis abundant*) typowych dla dojrzałych nasion, które przypuszczalnie chronią je przed wysuszeniem [19,20,46].

Kluczowe znaczenie dla poznania pojedynczych składników szlaku transdukcji sygnału ABA miała analiza molekularna *abi1* i *abi2*. Po ustaleniu sekwencji nukleotydowej sklonowanych genów okazało się, że kodują one białka wykazujące wysoką homologię do białkowych fosfatyz typu 2C (PP2C) [55,56,57,70,79]. Fosfatazy PP2C są klasą fosfatyz serynowo/treoninowych powszechnie występujących u *Eucaryota*. Białka ABI1 i ABI2 mają taką samą charakterystyczną strukturę pierwszorzędową (rys. 6). Domena C-końcowa wykazująca 86% identyczności z fosfatazami PP2C ma w obu białkach aktywność katalityczną zależną od magnezu i niewrażliwą na kwas okadejowy [7,57,70]. Domena N-końcowa ABI1 i ABI2 jest mniej konserwowana (49% identyczności) i nie przejawia większego podobieństwa do innych białek. Występuje w niej sekwencja przypominająca tzw. motyw dłoni EF, typowy dla białek wiążących wapń, natomiast niespotykany w białkach



RYSUNEK 6. Schemat budowy białek *ABI1* i *ABI2* z *A. thaliana* z zaznaczonym motywem dłoni wiążącym Ca^{2+} . Domena C-końcowa wykazuje podobieństwo do fosfataz typu 2C. Na schemacie zaznaczono także miejsca mutacji (na podstawie danych [56,57,70])

wiązujących magnez. Autorzy sugerują, że *ABI1* jest nowym typem enzymu funkcjonującego w szlakach sygnałowych – wyspecjalizowaną fosfatazą typu PP2C, której aktywność może być regulowana przez wapń. Możliwość taka wydaje się być szczególnie interesująca zważywszy na udział wapnia jako wtórnego przekaźnika w indukowanej przez ABA aktywacji kanałów jonowych w komórkach szparkowych. Mutacje *abil* i *abi2* polegają na zamianie pojedynczej pary zasad powodującej zmianę glicyny na asparaginę w domenie katalitycznej *ABI1* (Gly-180) i *ABI2* (Gly-168) [56,70]. Konsekwencją tej zmiany jest znacznie obniżona aktywność fosfatazowa obu białek [55,79]. Przez analogię do ludzkiej PP2C α o poznanej strukturze przestrzennej [cyt. za 55] przypuszcza się, że zamiana Gly na Asp zaburza konformację reszt sąsiadujących istotnych dla koordynacyjnego wiązania Mg^{2+} i aktywności enzymatycznej. Przypuszczenia te potwierdzają wyniki badań uzyskane dla *ABI2* wskazujące, że dla optymalnej aktywności wymagane jest wyższe stężenie Mg^{2+} w porównaniu z białkiem rośliny dzikiej [57].

Charakterystyka biochemiczna białka *ABI1* oraz dane eksperymentalne wyraźnie sugerują jego udział w szlaku sygnałowym zależnym od fosforylacji. *ABI1* wydaje się uczestniczyć w hamowaniu przez ABA aktywności mitotycznej, ponieważ w merystemach korzeniowych mutantów *abil* obserwowano aktywne podziały komórkowe, mimo hamującego stężenia ABA [56]. Można więc sądzić, że w odpowiedzi na kwas abscysynowy *ABI1* uniemożliwia procesy fosforylacji niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania cyklu komórkowego. Wskazują na to także rezultaty doświadczeń, w których wykazano, że egzogeny ABA hamuje u *A. thaliana* ekspresję genu kodującego kinazę zależną od cyklin, p34^{cdc2} odgrywającą kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego [25]. Opisywany wcześniej defekt w regulacji

działania aparatów szparkowych w transgenicznym tytoniu, transformowanym *abi-1*, można częściowo usunąć stosując działające w szerokim zakresie inhibitory kinaz białkowych (H7, staurosporyna) [5]. Odmienne wyniki uzyskano w badaniach ekspresji promotora genu *HVA1* w protoplastach z liści kukurydzy, w których obserwowano wzrost ekspresji pod wpływem ABA lub w wyniku nadekspresji niektórych kinaz białkowych [86]. W obydwu przypadkach aktywacja była obniżana przez nadekspresję domeny PP2C dzikiego typu białka ABI1. Powyższe rezultaty sugerują, że funkcjonowanie ABI1 w szlaku przekazywania sygnału ABA jest złożone: aktywność fosfatazowa jest konieczna do indukcji zamykania szparek w odpowiedzi na ABA, ale hamuje ekspresję będącego pod kontrolą hormonu promotora *HVA1*. Może to być odzwierciedleniem prawdziwych różnic pomiędzy szlakami transdukcji sygnału ABA w regulacji aktywności kanałów jonowych oraz ekspresji genów, która wymaga przekazania sygnału hormonalnego do jądra komórkowego.

Udział białek ABI1 i ABI2 jako fosfataz w odpowiedzi na ABA był przez dłuższy czas niezrozumiały. Jedyne znane początkowo allele, *abi1-1* i *abi2-1* [46] są dominujące, co uniemożliwiało ustalenie, czy białka są pozytywnymi czy negatywnymi regulatorami odpowiedzi na ABA. Dopiero wyselekcjonowanie mutantów supresorowych w stosunku do *abi1-1* dostarczyło genetycznych dowodów na to, że dziki typ fosfatazy ABI1 jest negatywnym regulatorem odpowiedzi na ABA i pełni funkcję represora w szlaku transdukcji sygnału ABA [28]. Efekty obserwowane w mutantach *abi* można by więc wytłumaczyć tym, że silnie zredukowana na skutek mutacji aktywność fosfatazy ABI1 hamuje defosforylację aktywnego w tej formie represora, który blokuje dalsze przekazywanie sygnału i powoduje brak wrażliwości na hormon. Mutacja *ABI2* ma także charakter dominujący, a bardzo wysoki stopień identyczności z *ABI1* sugeruje, że fosfataza *ABI2* może być również negatywnym regulatorem odpowiedzi na ABA. Wielu autorów uważa, że białko *ABI2* pełni te same funkcje co *ABI1* i jest niejako „na zapas” (ang. *redundancy*). Sugestie te mogłyby potwierdzać zidentyfikowanie u *A. thaliana* kolejnych dwóch białek homologicznych do *ABI1* [84], dla których przez analogię proponuje się także funkcje regulatorów negatywnych. Występowanie kilku wysoko homologicznych regulatorów negatywnych w szlakach sygnalizacyjnych u roślin nie jest czymś niezwykłym. Być może jest to typowe dla przekazywania sygnałów hormonalnych, ponieważ podobne zjawisko ma miejsce w szlaku sygnałowym etylenu, w którym funkcjonuje kilka homologów *ETR1*, receptora etylenu działającego jako negatywny regulator odpowiedzi na hormon [48]. Podobnie, białko *GAI* pełniące przypuszczalnie funkcję czynnika transkrypcyjnego oraz jego homolog *RGA*, uczestniczą jako negatywne regulatory odpowiedzi na gibereliny [49]. Niektórzy autorzy sugerują jednak, że funkcje białek *ABI1* i *ABI2* nie muszą pokrywać się całkowicie, ponieważ pewne odpowiedzi na stres i egzogeny ABA są silniej indukowane w przypadku *abi2* niż *abi1*, np. akumulacja mRNA niektórych genów odpowiadających na ABA, proces ryzogenezy wywoływany suszą [17,69]. Rozstrzygnięcie

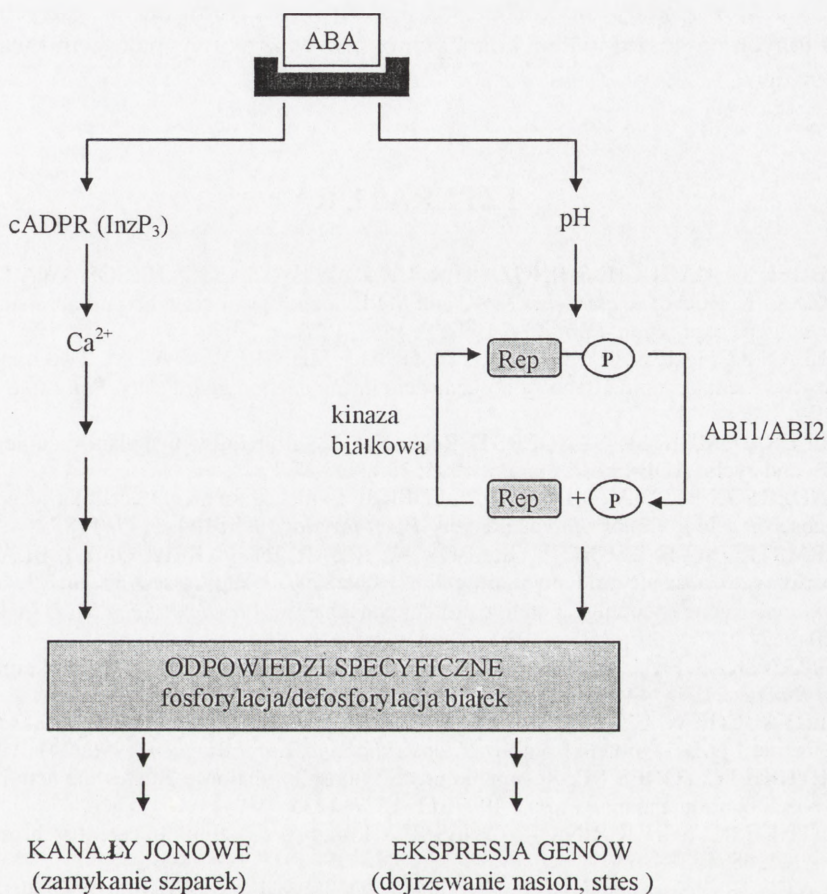
tego problemu będzie przypuszczalnie możliwe po zidentyfikowaniu endogennych substratów dla obydwu białkowych fosfatyz PP2C.

PODSUMOWANIE

Badania nad poznawaniem regulatorowej roli ABA w procesach wzrostu i rozwoju roślin przyniosły w ostatnim dziesięcioleciu istotny postęp w zrozumieniu molekularnych podstaw jego działania. Typowe analizy biochemiczne w połączeniu z nowoczesnymi metodami elektrofizjologicznymi i zaawansowanymi technikami genetyki molekularnej pozwoliły na wykazanie, że na poziomie całej rośliny, a nawet w pojedynczej komórce, występują przypuszczalnie różne typy białek receptorowych, których aktywacja przez ABA może wywołać odrębne odpowiedzi, być może w wyniku działania częściowo rozdzielonych szlaków sygnalizacyjnych. Pomimo uzyskania wielu ważnych i interesujących rezultatów, nasza wiedza, szczególnie dotycząca percepcji hormonu jak również identyfikacji poszczególnych ogniw w szlaku transdukcji sygnału hormonalnego, jest wciąż niepełna.

Przedstawione wyżej wyniki dotychczasowych badań nad percepcją kwasu abscysynowego, mimo że dość liczne, nie pozwalają jednoznacznie ustalić komórkowej lokalizacji potencjalnych receptorów ABA. Różnorodność, czasem wzajemnie wykluczających się rezultatów, jest z pewnością odbiciem plejotropowych efektów i złożonych mechanizmów regulacji typowych dla wszystkich fitohormonów. W związku z tym należałoby uwzględnić możliwość, że różne procesy mogą być regulowane przez odmienne typy receptorów zlokalizowanych w różnych przedziałach komórkowych, niekoniecznie jednakowych u różnych gatunków roślin. Jak dotąd, nie ustalono jednoznacznie, które z tzw. wtórnych przekaźników występujących w szlakach sygnalizacyjnych w komórkach zwierzęcych pośredniczą w przekazywaniu sygnału abscysynowego. Dotyczy to przede wszystkim Ca^{2+} , ponieważ możliwość funkcjonowania w komórkach szparkowych, a także w komórkach aleuronowych ziarniaków zbóż szlaku transdukcji ABA niezależnego od Ca^{2+} sugeruje, że w regulacji aktywności kanałów jonowych mogą uczestniczyć inne przekaźniki, np. cytoplazmatyczne pH. Sugestie te potwierdzają dane eksperymentalne wskazujące, że aktywacji kanałów transportujących K^+ na zewnątrz komórki towarzyszy wzrost stężenia H^+ w cytoplazmie [13]. Podobnie jest w przypadku cADPR. Na obecnym etapie badań uzyskano wstępne wyniki świadczące o tym, że cADPR wywołuje efekty podobne do tych, które są odpowiedzią na ABA. Jednak na pytania, czy i w jakim zakresie pośredniczy ona w przekazywaniu sygnału ABA nie można jeszcze udzielić satysfakcjonującej odpowiedzi.

Na podstawie uzyskanych do tej pory wyników proponowany jest hipotetyczny model objaśniający lokalizację i funkcję poszczególnych elementów szlaku syg-



RYSUNEK 7. Hipotetyczny model działania ABA. Wiązanie się ABA z receptorem indukuje powstawanie cADPR i wzrost cytozolowego pH. Przekazywanie sygnału abscysynowego może zachodzić w rozgałęzionym szlaku: w jednym, zależnym od Ca²⁺ uwalnianego z magazynów wewnątrzkomórkowych za pośrednictwem cADPR i/lub InzP₃, zachodziłaby kontrola pozytywna, w drugim znoszona byłaby kontrola negatywna przez defosforylację aktywnego represora (Rep-P) z udziałem fosfataz ABI1/ABI2 aktywowanych wzrostem pH (na podstawie [31,71])

nałowego ABA, przedstawiony schematycznie na rysunku 7. Związanie ABA ze specyficznym receptorem (receptorami) indukuje wytworzenie cADP-rybozy i wzrost pH w cytozolu. Transmisja sygnału ABA mogłaby odbywać się w dwóch rozgałęzieniach szlaku. W jednym z nich zachodziłaby kontrola pozytywna z udziałem Ca²⁺ uwalnianych za pośrednictwem cADPR i/lub InzP₃, w drugim następowałaby deaktywacja mechanizmu kontroli negatywnej przez fosfatazy ABI1/ABI2, które są silnie aktywowane wzrostem pH [55,79]. Wzrost aktywności fosfatazowej tych białek zmieniłaby stopień ufosforylowania endogennego substratu mającego kluczowe znaczenie dla dalszego przekazywania sygnału ABA. Model ten, choć hipo-

tetyczny i uproszczony może stanowić koncepcyjne zręby dla przyszłych badań nastawionych na poszukiwania kolejnych ogniw w szlaku sygnałowym kwasu abscysynowego.

LITERATURA

- [1] ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO T, IWASAKI T, HOSOKAWA D, SCHINOZAKI K. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 1997; **9**: 1859–1868.
- [2] ALLAN AC, FRICKER MD, WARD JL, BEALE MH, TREWAVAS AJ. Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 1994; **6**: 1319–1328.
- [3] ALLEN GJ, MUIR SR, SANDERS D. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science* 1995; **268**: 735–737.
- [4] ANDERSON BE, WARD JM, SCHROEDER JI. Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol* 1994; **104**: 1177–1183.
- [5] ARMSTRONG F, LEUNG J, GRABOV A, BREARLEY J, GIRAUDAT J, BLATT MR. Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K^+ channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9520–9524.
- [6] BARAŃSKA J. Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej. *Post Biochem* 1998; **44**: 201–208.
- [7] BERTAUCHE N, LEUNG J, GIRAUDAT J. Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 1996; **241**: 193–200.
- [8] BETHKE PC, JONES RL. Reversible protein phosphorylation regulates the activity of the slow-vacuolar ion channel. *Plant J* 1997; **11**: 1227–1235.
- [9] BETHKE PC, SCHUURINK R, JONES RL. Hormonal signalling in cereal aleurone. *J Exp Bot* 1997; **48**: 1337–1356.
- [10] BLATT MR. Reassessing roles for Ca^{2+} in guard cell signalling. *J Exp Bot* 1999; **50**: 989–999.
- [11] BLATT MR, THIEL G, TRENTHAM DR. Reversible inactivation of K^+ channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature* 1990; **346**: 766–769.
- [12] BLATT MR, THIEL G. Hormonal control of ion channel gating. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 543–567.
- [13] BLATT MR, GRABOV A. Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels. *Physiol Plantarum* 1997; **100**: 481–490.
- [14] BROWN AM, BIRNBAUMER L. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu Rev Physiol* 1990; **52**: 197–213.
- [15] BUSK PK, PAGÈS M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 1998; **37**: 425–435.
- [16] BUSK PK, BORRELL A, KIZIS D, PAGÈS M. Abscisic acid perception and transduction. [w] Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR [red.] *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science BV 1999: 491–512.
- [17] CHAK RKF, THOMAS TL, QUATRANO RS, ROCK CD. The genes *ABI1* and *ABI2* are involved in abscisic acid- and drought-inducible expression of the *Daucus carota* L. *Dc3* promoter in guard cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 2000; **210**: 875–883.

- [18] FAIRLEY-GRENOT K, ASSMANN SM. Evidence for G-protein regulation of inward K⁺ channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell* 1991; **3**: 1037–1044.
- [19] FINKELSTEIN RR. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J* 1994; **5**: 765–771.
- [20] FINKELSTEIN RR, SOMERVILLE CR. Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol* 1990; **94**: 1172–1179.
- [21] FINKELSTEIN RR, WANG ML, LYNCH TJ, RAO S, GOODMAN HM. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 1998; **10**: 1043–1054.
- [22] FINKELSTEIN RR, LYNCH TJ. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 2000; **12**: 599–609.
- [23] GILROY S, READ ND, TREWAVAS AJ. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 1990; **346**: 769–771.
- [24] GILROY S. Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. *Plant Cell* 1996; **8**: 2193–2209.
- [25] GIRAUDAT J. Abscisic acid signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 232–238.
- [26] GIRAUDAT J, HAUGE BM, VALON C, SMALLE J, PARCY F, GOODMAN HM. Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* 1992; **4**: 1251–1261.
- [27] GIRAUDAT J, PARCY F, BERTAUCHE N, GOSTIF, LEUNG J, MORRIS P-C, BOUVIER-DURAND M, VARTANIAN N. Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1557–1577.
- [28] GOSTIF, BEAUDOIN N, SERIZET C, WEBB AAR, VARTANIAN N, GIRAUDAT J. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 1999; **11**: 1897–1909.
- [29] GRABOV A, LEUNG J, GIRAUDAT J, BLATT MR. Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J* 1997; **12**: 203–213.
- [30] GRABOV A, BLATT MR. Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. *J Exp Bot* 1998; **49**: 351–360.
- [31] GRILL E, HIMMELBACH A. ABA signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 412–418.
- [32] GUILTINAN MJ, MARCOTTE Jr WR, QUATRANO RS. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 1990; **250**: 267–271.
- [33] GUSE AH. Cyclic ADP-ribose: a novel Ca²⁺-mobilising second messenger. *Cell Signal* 1999; **11**: 309–316.
- [34] HARTUNG W. The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Environm* 1983; **6**: 427–428.
- [35] HATTORI T, TERADA T, HAMASUNA S. Regulation of the *Osem* gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of *cis*-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *Plant J* 1995; **7**: 913–925.
- [36] HOBO T, KOWYAMA Y, HATTORI T. A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 15348–15353.
- [37] HOCKING TJ, CLAPHAM J, CATTELL KJ. Abscisic acid binding to subcellular fractions from leaves of *Vicia faba*. *Planta* 1978; **138**: 303–304.
- [38] HORNBERG C, WEILER EW. High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 1984; **310**: 321–324.
- [39] IRVING HR. Abscisic acid induction of GTP hydrolysis in maize coleoptile plasma membranes. *Aust J Plant Physiol* 1998; **25**: 539–546.
- [40] JEANNETTE E, RONA J-P, BARDAT F, CORNEL D, SOTTA B, MIGINIAC E. Induction of *RAB18* gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an

- extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* 1999; **18**: 13–22.
- [41] JIN X-C, WU W-H. Involvement of cyclic AMP in ABA- and Ca^{2+} -mediated signal transduction of stomatal regulation in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 1127–1133.
- [42] JOFUKU KD, DenBOER BGW, VanMONTAGU M., OKAMURO JK. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 1994; **6**: 1211–1225.
- [43] KACPERSKA A. Udział hormonów roślinnych w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska. *Kosmos* 1995; **44**: 623–637.
- [44] KAO C-Y, COCCIOLONE SM, VASIL IK, McCARTY DR Localization and interaction of the *cis*-acting elements for abscisic acid, *VIVIPAROUS1*, and light activation of the *C1* gene of maize. *Plant Cell* 1996; **8**: 1171–1179.
- [45] KEARNS EV, ASSMANN SM. The guard cell-environment connection. *Plant Physiol* 1993; **102**: 711–715.
- [46] KOORNNEEF M, REULING G, KARSSSEN CM. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 1984; **61**: 377–383.
- [47] KOORNNEEF M, LÉON-KLOOSTERZIEL KM, SCHWARTZ SH, ZEEVAART JAD. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 1998; **36**: 83–89.
- [48] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Receptory etylenu, cytokinin i brasinosteroidów – transmembranowymi kinazami białkowymi? *Post Biol Kom* 1999; **26**: 3–32.
- [49] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Gibereliny - percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 397–423.
- [50] LECKIE CP, McAINSH MR, ALLEN GJ, SANDERS D, HETHERINGTON AM. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15837–15842.
- [51] LECKIE CP, McAINSH MR, MONTGOMERY L, PRIESTLEY AJ, STAXEN I, WEBB AAR, HETHERINGTON AM. Second messengers in guard cells. *J Exp Bot* 1998; **49**: 339–349.
- [52] LEE HC. A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol Chem* 1999; **380**: 785–793.
- [53] LEE HJ, TUCKER EB, CRAIN RC, LEE Y. Stomatal opening is induced in epidermal peels of *Commelina communis* L. by GTP analogs or pertussis toxin. *Plant Physiol* 1993; **102**: 95–100.
- [54] LEGOCKA J. Działanie regulatorów wzrostu w roślinie. [w] Jankiewicz LS [red.] Regulatory wzrostu i rozwoju roślin 1. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN 1997: 199–225.
- [55] LEUBE MP, GRILL E, AMRHEIN N. *ABI1* of *Arabidopsis* is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Lett* 1998; **424**: 100–104.
- [56] LEUNG J, BOUVIER-DURAND M, MORRIS P-C, GUERRIER D, CHEFDOR F, GIRAUDAT J. *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 1994; **264**: 1448–1452.
- [57] LEUNG J, MERLOT S, GIRAUDAT J. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 1997; **9**: 759–771.
- [58] LEUNG J, GIRAUDAT J. Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 199–222.
- [59] LEWAK S. Hormony roślinne – kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos* 1995; **44**: 601–622.
- [60] LI J, LEE Y-RJ, ASSMANN SM. Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the *KAT1* potassium channel. *Plant Physiol* 1998; **116**: 785–795.
- [61] LI J, WANG X-Q, WATSON MB, ASSMANN SM. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 2000; **287**: 300–303.

- [62] LOVEGROVE A, HOOLEY R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 102–110.
- [63] LUAN S, LI W, RUSNAK F, ASSMANN SM, SCHREIBER SL. Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K^+ channels in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2202–2206.
- [64] LUAN S. Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 271–275.
- [65] MacROBBIE EAC. Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. *J Exp Bot* 1997; **48**: 515–528.
- [66] MARCOTTE WR, RUSSELL SH, QUATRANO RS. Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1989; **1**: 969–976.
- [67] McCARTY DR, HATTORI T, CARSON CB, VASIL V, LAZAR M, VASIL IK. The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 1991; **66**: 895–905.
- [68] McCARTY DR Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995; **46**: 71–93.
- [69] MERLOT S, GIRAUDAT J. Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiol* 1997; **114**: 751–757.
- [70] MEYER K, LEUBE MP, GRILL E. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 1994; **264**: 1452–1455.
- [71] MØRLLER SG, CHUA N-H. Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J Mol Biol* 1999; **293**: 219–234.
- [72] MORI IC, MUTO S. Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol* 1997; **113**: 833–839.
- [73] MUIR SR, SANDERS D. Pharmacology of Ca^{2+} release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants. *FEBS Lett* 1996; **395**: 39–42.
- [74] OHME-TAKAGIM, SHINSHI H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 1995; **7**: 173–182.
- [75] OKAMURO JK, CASTER B, VILLARROEL R, VANMONTAGU M, JOFUKU KD. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7076–7081.
- [76] ONO A, IZAWA T, CHUA N-H, SHIMAMOTO K. The *rab16B* promoter of rice contains two distinct abscisic acid-responsive elements. *Plant Physiol* 1996; **112**: 483–491.
- [77] PEI Z-M, WARD JM, HARPER JF, SCHROEDER JI. A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase CDPK. *EMBO J* 1996; **15**: 6564–6574.
- [78] PEI Z-M, SCHROEDER JI, SCHWARZ M. Background ion channel activities in *Arabidopsis* guard cells and review of ion channel regulation by protein phosphorylation events. *J Exp Bot* 1998; **49**: 319–328.
- [79] RODRIGUEZ PL, BENNING G, GRILL E. ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 1998; **421**: 185–190.
- [80] SCHMIDT C, SCHELLE I, LIAO Y-J, SCHROEDER JI. Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9535–9539.
- [81] SCHROEDER JI, SCHMIDT C, SHEAFFER J. Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* 1993; **5**: 1831–1841.
- [82] SCHWARTZ A, WU W-H, TUCKER EB, ASSMANN SM. Inhibition of inward K^+ channels and stomatal response by abscisic acid: An intracellular locus of phytohormone action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4019–4023.

- [83] SHEEN J. Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 1996; **274**: 1900–1902.
- [84] SHEEN J. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 975–980.
- [85] SHEN Q, HO T-HD. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* 1995; **7**: 295–307.
- [86] SHEN Q, ZHANG P., HO T-HD. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 1996; **8**: 1107–1119.
- [87] SHEN Q, HO T-HD. Promoter switches specific for abscisic acid (ABA)-induced gene expression in cereals. *Physiol Plantarum* 1997; **101**: 653–664.
- [88] STAXÈN I, PICAL CH, MONTGOMERY LT, GRAY JE, HETHERINGTON AM, McAINSH MR. Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1779–1784.
- [89] SUZUKI M, KAO C-Y, McCARTY DR The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* 1997; **9**: 799–807.
- [90] WARD JM, PEI Z-M, SCHROEDER JL. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* 1995; **7**: 833–844.
- [91] WEBB AAR, HETHERINGTON AM. Convergence of the abscisic acid, CO_2 , and extracellular calcium signal transduction pathways in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 1997; **114**: 1557–1560.
- [92] ZHANG D, ZHANG Z, CHEN J, JIA W. Specific abscisic acid-binding sites in mesocarp of grape berry: properties and subcellular localization. *J Plant Physiol* 1999; **155**: 324–331.
- [93] ZIEGLER M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 1550–1564.
- [94] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 26.06.2000 r.

Przyjęto: 25.08.2000 r.

Adres autora: 87-100 Toruń, ul. Gagarina 9

E-mail: anjakubo@cc.uni.torun.pl

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski		j. angielski
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3–5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

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

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2000 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2001

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2001 pod adresem:
 FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99,
 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl
 na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.
 Cena prenumeraty rocznika na rok 2001:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł,
 a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2001 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
 tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

KOMUNIKATY

28 Konferencja szkoleniowa z zakresu biologii komórki

Uprzejmie zawiadamiamy, że Zarząd Główny Towarzystwa Anatomicznego i Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików, Redakcja Postępów Biologii Komórki oraz Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej organizują doroczną konferencję szkoleniową na temat:

„Różnicowania komórek *Eukariota*”

która odbędzie się w dniu 4 listopada (sobota) 2000 r. w Warszawie, w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w „Anatomicum” Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5. Początek obrad o godz. 10.00.

Opłata za uczestnictwo 10 zł płatna na miejscu obrad. W ramach opłaty uczestnicy otrzymają suplement nr 15 PBK zawierający materiały Konferencji.

Program konferencji:

10.00 *Otwarcie konferencji*

10.05 *Mechanizmy przestrzennego różnicowania zarodka*

A. Kaczanowski i J. Kaczanowska

11.50 *Lokalizacja morfogenów w oocytach kręgowców*

M. Kloc, S. Biliński

12.35 *Różnicowanie komórek we wczesnych stadiach rozwojowych*

M. Maleszewski

13.00 *System do transfekcji komórek (GIBCO)*

R. Wójtowicz

13.30–14.00 *Przerwa*

14.00 *Różnicowanie komórek mięśni kręgowców*

J. Moraczewski

14.45 *Różnicowanie komórek zrębu grasicy*

R. Brelińska

15.30 *Podsumowanie*

S. Biliński

Uczestnikom Konferencji zostaną udostępnione po niższej cenie zeszyty PBK.

Warszawa, wrzesień 2000 r.

Organizatorzy

Errata

do artykułu **Anny Kowalczyk** pt. „Czy zwierzęta z celowaną modyfikacją genomu są wiarygodnym modelem badawczym? Lekcje z neurobiologii” *Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: (3) 325–342.

W artykule tym nie znalazły się następujące adresy autorki:
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 oraz
Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Zwierzętarnia, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych (koniecznie z ostatnich 5 lat (mimo to wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi));

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 657) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. I, rys. 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] SACHSENAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków 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 rysunki i zdjęcia są płatne. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko I. autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Poprawiona po recenzji wersja pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu,		Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została wysłana do innej redakcji	tak	nie	
tabel i rycin.	tak	nie			
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	tak	nie	Dołączono kopię pracy wraz z rysunkami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	tak	nie
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	nie	z komputera IBM	tak	nie
			Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.	tak	nie

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

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym Zeszyście	465
BEDNARSKA E., LENARTOWSKA M.: Rola wapniowego systemu przekazywania sygnałów w regulacji wzrostu łagiewek pyłkowych Role of calcium signalling in the pollen tube growth regulation	467
CISZAK L., WOŁOWIEC D., KOSMACZEWSKA A., BOĆKO D., FRYDECKA I.: Białko p27: Budowa, funkcje biologiczne oraz udział w patomechanizmie procesów rozrostowych Cyclin-dependent kinase inhibitor p27: Structure, role in cell physiology and in malignancies	481
BRYNIARSKI K.: Makrofagi gonady męskiej Testicular macrophages	505
SULEJCZAK D.: Apoptoza i metody jej identyfikacji Apoptosis and methods of identification of this phenomenon	527
KUBIAK J. Z.: Cykl komórkowy – dwie konferencje w 30-lecie badań Cell cycle – two conferences for 30 th anniversary of studies	569
WIDŁAK P.: Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie Mechanisms of DNA fragmentation and chromatin condensation in cells undergoing apoptosis	583
ŻEROMSKI J.: Miejsce i rola molekuly CD56/NCAM w biologii i medycynie Place and role of CD56/NCAM molecule in biology and medicine	599
JÓZEFOWSKI S.: Deteckja i transdukcja sygnału w reakcjach odpornościowych roślin. I. Rozpoznanie i wczesne etapy transdukcji sygnału Signal detection and transduction involved in plant disease resistance. I. Recognition and early signal transduction	609
JÓZEFOWSKI S.: Deteckja i transdukcja sygnału w reakcjach odpornościowych roślin. II. Aktywacja transkrypcji genów. Signal detection and transduction involved in plant disease resistance. II. Defense gene activation	623
JAKUBOWSKA A., KOWALCZYK S.: Kwas abscysynowy – Percepcja i transdukcja sygnału Abscisic acid – Perception and signal transduction	633
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	657
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	657
Komunikat	658
Errata	659