

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 29, ISSUE 3/2002  
(363–528)

# 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, cytoskielet, 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 UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, 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, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

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 PBK

- Większość białek mitochondrialnych jest importowana z cytoplazmy. Podstawową rolę w tym procesie odgrywają kompleksy białkowe zlokalizowane w zewnętrznej i wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Zakłócenia w imporcie białka do mitochondriów mogą stanowić przyczynę nowej klasy chorób pochodzenia mitochondrialnego. Artykuł na ten temat jest na stronie 379.
- Poród u ssaków prowadzi do wyjścia płodu ze sterylnej, w normalnych warunkach, macicy do środowiska zewnętrznego, gdzie noworodek ma kontakt z czynnikami zakaźnymi. Makrofagi tworzą komórkową linię obrony, której najważniejszymi mechanizmami są fagocytoza i prezentacja antygeny. Obecny stan wiedzy na temat roli makrofagów i niektórych cytokin w układzie rozrodczym ssaków opisano na stronie 409.
- Modyfikacja komórek genami dla cytokin jest intensywnie rozwijającym się kierunkiem terapii nowotworów. Wykazano, że do jednej ze skuteczniejszych możliwości terapii należy wprowadzenie genu dla interleukiny 12 (IL-12). Przeprowadzone na zwierzętach badania pozwalają wierzyć w skuteczność takiego postępowania, co pozwoliło również rozpocząć pierwsze próby kliniczne. Bliżej o tym na stronie 465.
- Rodzina białek transkrypcyjnych Rel/NFκB pełni ważną rolę w regulacji procesów zapalenia i odpowiedzi immunologicznych, a również w rozwoju nowotworów – patrz artykuł na stronie 487.

## WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 28 Z ROKU 2001 REFEREES OF THE VOLUME 28, 2001

prof. dr hab. S. Biliński  
doc. dr hab. Barbara Czartoryska  
prof. dr hab. Maria Jerka-Dziadosz  
prof. dr hab. B. Grzelakowska-Sztabert  
doc. dr hab. Amalia Guzek  
doc. dr hab. B. Kamińska  
prof. dr hab. Jerzy Kawiak  
prof. dr hab. W. Kilariski  
prof. dr hab. Liliana Konarska  
prof. dr hab. A. K. Kononowicz  
prof. dr hab. Halina Krzanowska

dr Katarzyna Kwiatkowska  
prof. dr hab. Piotr Leider  
prof. dr hab. M. J. Olszewska  
prof. dr hab. Zofia Osuchowska  
prof. dr hab. B. Płytycz  
prof. dr hab. S. Rogalska  
prof. dr hab. med. D. Rożynkova  
prof. dr hab. Lidia Różewicka  
prof. dr hab. K. Staroń  
prof. dr hab. K. Szyfter





## METODA MIKROJĄDER W BADANIACH EPIDEMIOLOGICZNYCH

### THE MICRONUCLEUS TECHNIQUE IN EPIDEMIOLOGICAL STUDIES

Agnieszka CIERNIAK, Maria KAPISZEWSKA

Zakład Biochemii Ogólnej, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie:* Technika mikrojąder stosowana jest do oceny stopnia uszkodzeń chromosomów na poziomie pojedynczej komórki. Mikrojądra pochodzą z fragmentów chromosomów, a także całych chromosomów nieprawidłowo rozdzielonych podczas podziału komórkowego. Metoda ta jest łatwa do zastosowania w ludzkich limfocytach i tym samym nadaje się do prowadzenia badań monitoringowych na ludzkich populacjach. Obecnie jest ona szeroko stosowana do oceny wpływu zarówno środowiskowych i genetycznych czynników, jak i stylu życia na stabilność genetyczną. W pracy tej opisano podstawowe zasady leżące u podstaw tej metody włączając w to sposób zliczania i kryteria oceny mikrojąder. Dokonano również przeglądu wybranych pozycji literatury, w których częstość pojawiania się mikrojąder była zastosowana jako biomarker podatności na nowotwory i inne choroby degeneracyjne. Omówiono także wpływ genetycznie uwarunkowanych metabolicznych polimorfizmów na różne biologiczne markery ryzyka genotoksycznego po ekspozycji na środowiskowe i zawodowe czynniki.

*Słowa kluczowe:* mikrojądra, limfocyty, genotoksyczność

*Summary:* The micronucleus assay measure chromosome damage at the level of single cells. Micronuclei originate from chromosome fragments or whole chromosomes that are not included in the main daughter nuclei during nuclear division. The method is very easily applied to human lymphocytes and in various cell types, and therefore lends itself to human biomonitoring studies. This assay is now in widespread use to assess effect of the impact of environmental, genetic and lifestyle factors on genomic stability.

The underlying principles of this assay including criteria for scoring micronuclei are described. Moreover, this paper describes some of the results published in the literature where frequency of micronucleus was used as a biomarker of cancer risk and other degenerative diseases. The influence of metabolic genotypes on different biological markers of genotoxic risk in environmental or occupational exposure is reviewed.

*Key words:* micronuclei, lymphocytes, genotoxicity.

## WSTĘP

Niebezpieczeństwo, jakie niesie ekspozycja na czynniki genotoksyczne, w dużej mierze zależy od podatności osobniczej związanej ze sposobem metabolizowania genotoksycznego związku, od wydajności układów naprawiających uszkodzenia DNA czy od obecności mutacji w onkogenach czy genach supresorowych. Genetyczny polimorfizm enzymów metabolizujących mutageny i kancerogeny, w tym genów CYP kodujących enzymy cytochromu P450, transferazy glutationowe czy N-acetylo-transferazy, może zmienić ryzyko powstania nowotworu nawet 2–10-krotnie [3]. Oznacza to, że wyznaczenie bezpiecznej granicy ekspozycji na dany czynnik powinno uwzględniać powyższe składowe fizjologicznej odpowiedzi organizmu na czynniki genotoksyczne. Mimo że badania nad polimorfizmami genetycznymi postępują szybko, a ich rezultaty w przyszłości pomogą w ocenie indywidualnej predyspozycji na rozwój choroby nowotworowej i innych chorób degeneracyjnych, to nie należy spodziewać się, aby polimorfizm genetyczny miał wkrótce stać się powszechnie stosowanym biomarkerem w badaniach nad zagrożeniami środowiskowymi. Zautomatyzowanie technologii mikroprocesorów DNA (*DNA-chip technology*), a tym samym znaczne obniżenie kosztów jej zastosowania, jest wielką szansą na wprowadzenie metod badania genów polimorficznych, jako ważnego biomarkera do badań epidemiologii molekularnej, zwłaszcza że etiologia tych chorób dotyczy zwykle nie jedno-, ale wieloskładnikowego zespołu czynników genotoksycznych. Najpilniejszym zadaniem epidemiologii molekularnej prowadzącej biologiczne badania biomonitoringowe jest znalezienie uniwersalnego biomarkera pozwalającego na ocenę narażenia organizmu na czynniki genotoksyczne. Badania na poziomie molekularnym analizujące związek przyczynowy pomiędzy ekspozycją na czynniki genotoksyczne a efektem biologicznym pomogą w zrozumieniu mechanizmów prowadzących do powstawania nowotworów.

Skutki ekspozycji na czynniki genotoksyczne mogą być oceniane klasycznymi metodami cytogenetycznymi, takimi jak: analiza aberracji chromosomowych, wymiana chromatyd siostrzanych, zmiany w ilości chromosomów [29,30,33,34,35,36]. Metody te są jednak czasochłonne i kosztowne. Prosta metoda pozwalająca na szybkie, tanie, powtarzalne i wiarygodne przeprowadzenie oceny chromosomowych mutacji na dużej liczbie komórek polega na określeniu częstości występowania w komórce struktur nazwanych mikrojądrami. Zalety tej metody czynią ją niezwykle przydatną w



prowadzonych na dużych populacjach badaniach epidemiologicznych. Wykorzystywana jest ona także w toksykologii genetycznej oceniającej wpływ różnych mutagennych i kancerogennych czynników na genom komórkowy, a także w ocenie wpływu suplementów o działaniu prewencyjnym [4,12,14,15,20,22].

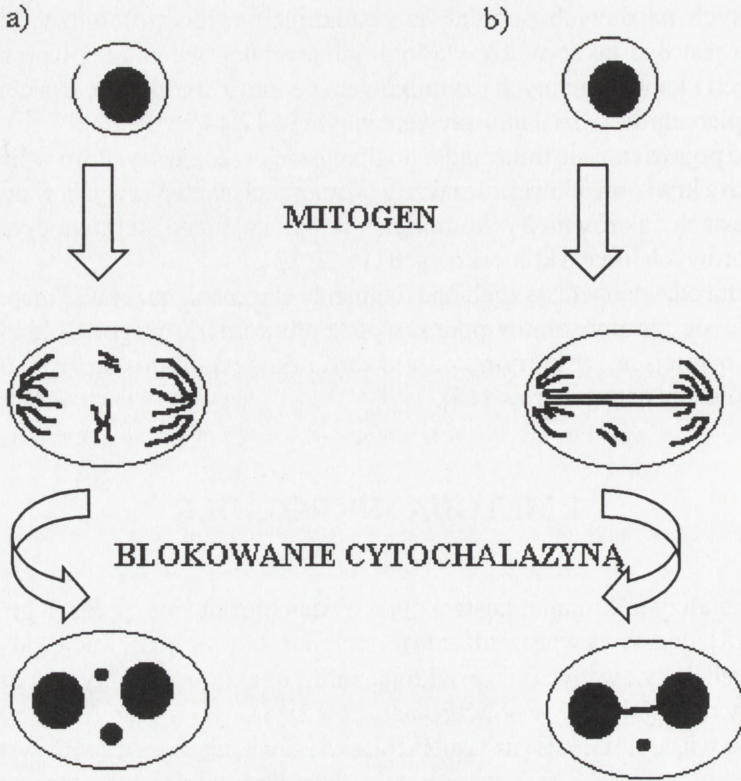
Częstość pojawienia się mikrojąder analizuje się przede wszystkim w limfocytach izolowanych z krwi obwodowej, ale także w komórkach nabłonkowych, w erytrocytach i w fibroblastach, jak również w komórkach szpiku kostnego, keratynocytach skóry i w nowotworowych liniach komórkowych [15,22,23].

Mikrojądra odzwierciedlają zgubione fragmenty chromosomu, a także nieprawidłowe rozdzielanie się chromosomów podczas podziału komórkowego. Dokładniejszych informacji o miejscu, w którym doszło do uszkodzenia, dostarcza identyfikacja kinetochorów czy centromerów [15].

## 1. METODA MIKROJĄDER

Metoda analizy mikrojąder została opracowana niezależnie przez Schmida [32] i Heddle'a [18]. Podstawą wprowadzenia tej techniki stały się obserwacje powstawania ciałek Howell-Jolly, zwanych także mikrojądami, podczas procesu erytropoezy [15,22]. Erytroblasty rozwijając się w polichromatyczne erytrocyty – PCE (młode erytrocyty bazofilne, barwiące się Giemśą na jasnoniebiesko i zawierające jeszcze RNA) wyrzucają jądro komórkowe z komórki. Z czasem stają się erytrocytami normo-chromatycznymi – NCE (dojrzałe erytrocyty, acidofilne, mniejsze niż PCE, barwiące się na jasnopomarańczowo), tracą RNA i zawierają głównie hemoglobinę. W procesie erytropoezy chromosomy komórek macierzystych wchodząc w fazę proliferacji i dojrzewania mogą ulec uszkodzeniu (złamanie lub wymiana). Pojawienie się takich anomalii we fragmencie lub całym chromosomie prowadzi do powstania struktur zawierających fragmenty chromosomów otoczonych błoną jądrową. Widoczne są one w cytoplazmie jako struktury jądropodobne o znacznie mniejszych wymiarach, stąd nazwa – mikrojądra. Zarówno w organizmie człowieka, jak i myszy, gdzie proces ten jest dobrze scharakteryzowany, erytrocyty z mikrojądami usuwane są w śledzionie [15,22].

Analizę mikrojąder przeprowadza się zwykle w populacji komórek dzielących się lub stymulowanych do podziału. Zastosowanie tej metody do badania komórek znajdujących się w fazie  $G_0$  wymaga zastosowania mitogenów. Ze względu na niepewny los mikrojąder w dalszych podziałach oceny częstości ich występowania dokonuje się po pierwszym podziale komórkowym (ryc. 1). Po zakończonym podziale i wykształceniu obydwu jąder, cytokineza blokowana jest przy pomocy cytochalazyny B (*cytokinesis-block micronucleus*). Cyt-B jest inhibitorem polimeryzacji mikrofilamentów aktynowych. Zastosowanie jej umożliwia faktyczną akumulację wszystkich dwujądrowych komórek bez względu na stopień zsynchronizowania w cyklu komórkowym i wielkość



RYSUNEK 1. Formowanie mikrojąder z całych opóźnionych chromosomów lub acentrycznych fragmentów w anafazie: a – dwujądrowa komórka z dwoma różnej wielkości mikrojądrami. Formowanie mostków nukleoplazmatycznych z dicentrycznych chromosomów, w których centromery są ciągnięte do przeciwległych biegunów komórki: b – dwujądrowa komórka z jednym mikrojądrem

populacji dzielących się komórek. Złamane fragmenty chromosomu, często z brakującym centromerem i/lub całe chromosomy, niezdolne do przemieszczenia się w obszar wrzeciona kariokinetycznego podczas mitozy, zostają otoczone w telofazie otoczką jądrową i stopniowo przybierają morfologię jądra interfazowego. Procentowy udział komórek zawierających mikrojądra, a także sama ilość mikrojąder w komórce dwujądrowej dostarczają zatem informacji o skali uszkodzenia. Sporadycznie w takich dwujądrowych komórkach obserwuje się połączenie między jądrami świadczące, że w trakcie podziału doszło do zaburzeń w przegrupowaniu chromosomów. Takie połączenie ma miejsce, kiedy centromery dicentrycznych chromosomów są ściągane do przeciwległych biegunów podczas anafazy.

Stosowanie metody mikrojądrowej jako biomarkera zagrożenia chorobami nowotworowymi przez coraz większą liczbę placówek zrodziło pilną potrzebę jej wystandaryzowania. Było to tym pilniejsze, że wstępne wyniki badań uzyskanych w ramach międzynarodowego projektu pod nazwą Mikrojądra Człowieka (*Human Micro-*



*Nucleus* – HUMN), rozpoczętego w 1997 roku wskazywały, że główne przyczyny rozbieżności wyników między laboratoriami są efektem różnic w stosowanym protokole oraz w sposobie liczenia i oceny mikrojąder [4,12]. W rezultacie Michael Fenech [14,15] opublikował wystandaryzowany protokół postępowania dotyczący zarówno metody przygotowania limfocytów do pomiaru, jak i kryteriów obowiązujących przy ocenie i liczeniu mikrojąder.

## 2. PROCEDURA I KRYTERIA OBOWIĄZUJĄCE PRZY UŻYCIU METODY MIKROJĄDROWEJ Z BLOKOWANIEM CYTOKINEZY

W metodzie mikrojądrowej stosuje się blokowanie cytokinezy (CBMN – *cytokinesis-block micronucleus assay*) w limfocytach ludzkich stymulowanych do podziału.

### 2.1. Izolacja limfocytów i hodowla komórek

Limfocyty z pełnej krwi są izolowane przy użyciu Ficoll Paque, a następnie umieszczane w pożywce RPMI 1640 zawierającej 10–15% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej. Gęstość takiej zawiesiny komórek powinna wynosi 0,5–1 mln/ml. Wyizolowane limfocyty z krwi obwodowej występują w fazie  $G_0$ . Możliwość ich stymulacji do podziałów pozwala na ocenę genotoksyczności badanego czynnika na każdym etapie cyklu komórkowego [14,15].

Po 44 godzinach hodowli od dodania mitogenu, fitohemaglutyniny (stężenie zależy od stopnia jej czystości i źródła) dodaje się cytochalazyny B w stężeniu 4,5  $\mu\text{g}$  na mililitr hodowli na 28 godzin. Następnie zawiesinę odwirowuje się i utrwala (metanol : lodowaty kwas octowy, 4 : 1) oraz wykonuje się preparaty mikroskopowe na szkiełkach i barwi je. Ludzkie limfocyty uzyskane w hodowli z pełnej krwi wymagają zastosowania łagodnego szoku osmotycznego (0,075 M KCl) przed utrwaleniem. Optymalne warunki hodowli mogą dostarczać 35–60% dwujądrowych komórek zdolnych do życia (pomijając komórki nekrotyczne i apoptotyczne).

### 2.2. Szacowanie ilości mikrojąder

Utrwalone i wybarwione na szkiełkach komórki, w zależności od zastosowanego barwnika, analizowane są w mikroskopie świetlnym lub fluorescencyjnym przy powiększeniu 1000x. Struktury cytoplazmatyczne określone jako mikrojądra są morfologicznie identyczne, lecz mniejsze niż główne jądro komórkowe. W ludzkich limfocytach średnica mikrojąder równa się zwykle od 1/16 do 1/3 średnicy jądra komórkowego. Mikrojądra nie załamują światła i dlatego łatwo jest je odróżnić od artefaktów, takich jak zabarwione cząsteczki. Prawidłowe mikrojądra nie są związane lub połączone z jądrem komórkowym. Mogą stykać się z jądrem, ale wtedy otoczka mikrojąder musi być wyraźnie odróżnialna od otoczki jądra.

Analizie poddaje się 1000 komórek i ocenia częstość występowania:

1. komórek dwujądrowych,
2. komórek zawierających w pojedynczej komórce dwujądrowej 1, 2 lub więcej mikrojąder,
3. mostków nukleoplazmatycznych w dwujądrowych komórkach,
4. 1-, 2-, 3- i 4-jądrowych komórek na 500 liczonych komórek – informacja potrzebna do obliczenia wskaźnika podziału jądrowego (WPJ) – według wzoru zaproponowanego przez Eastmona i Tuckera:

$$WPJ = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

gdzie: M1 – M4 oznacza ilość komórek z 1 do 4 jądrami, a N oznacza całkowitą liczbę zdolnych do życia komórek.

WPJ oraz proporcja dwujądrowych komórek są użytecznymi parametrami do porównywania mitogennej odpowiedzi limfocytów oraz badania cytostatycznych efektów wywołanych przez różne czynniki.

5. komórek apoptotycznych i nekrotycznych (na 500 liczonych komórkach) – wskaźnik cytotoksycznego podziału jądra (WCPJ). Bardziej wiarygodnym pomiarem wyznaczającym status podziału jądra jest uwzględnienie w równaniu komórek nekrotycznych i apoptotycznych. Jest to bardzo ważne, gdyż wyższa dawka testowanych genotoksycznych czynników zwiększa liczbę martwych komórek.

$$WCPJ = [Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

gdzie: Ap oznacza ilość komórek apoptotycznych, Nec oznacza ilość komórek nekrotycznych, natomiast N – ilość wszystkich liczonych komórek.

### 2.3. Selekcja dwujądrowych komórek zawierających mikrojądra

Komórki muszą zawierać dwa jądra komórkowe, które w przybliżeniu mają jednakowy rozmiar. Jądra w dwujądrowych komórkach mogą:

- mieć złączone błony jądrowe,
- być powiązane mostkiem nukleoplazmatycznym o szerokości nie większej niż 1/4 średnicy jądra. Błona cytoplazmatyczna takich komórek musi być nienaruszona i wyraźnie odróżniać się od błon sąsiadujących komórek.

### 2.4. Liczenie mostków nukleoplazmatycznych

Mostki nukleoplazmatyczne, obserwowane w niektórych dwujądrowych komórkach, są najczęściej rezultatem ekspozycji na promieniowanie jonizujące lub wolne rodniki. Są to ciągłe połączenia między jądrami, których szerokość może być zmienna,



lecz zwykle nie przewyższa 1/4 średnicy jądra komórkowego. Często komórki zawierające mostki nukleoplazmatyczne mają więcej niż jedno mikrojądro.

## 2.5. Liczenie komórek apoptotycznych i nekrotycznych

Izolowane limfocyty lub linie komórkowe nie wymagają hipotonicznego traktowania (w przeciwieństwie do limfocytów hodowanych z pełnej krwi). Umożliwia to zachowanie nienaruszonej morfologii komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Jako apoptotyczne liczone są te komórki, które wykazują kondensację chromatyny i/lub fragmentację jądra oraz fragmentację cytoplazmy i tworzenie ciałek apoptotycznych z dobrze zachowanymi organellami. Jako nekrotyczne liczone są te komórki, które wykazują pęknięcia błony komórkowej, liczne wakuole i rozpad organelli.

## 2.6. Identyfikacja w mikrojądrach chromosomów zgubionych lub nierozdzielnych

W analizie CBMN istotne jest rozróżnienie mikrojąder utworzonych z całych chromosomów lub ich acentrycznych fragmentów. Sugerowanie się wielkością mikrojądra nie jest jednak właściwą metodą oceny w przypadku komórek, w których wielkość chromosomów jest heterogenna, w szczególności w ludzkich limfocytach. Może się zdarzyć, że „małe” mikrojądra mogą zawierać jeden lub oba fragmenty „dużych” chromosomów lub całe „małe” chromosomy. Dlatego prostą i niedrogą techniką jest użycie przeciwciał specyficznych dla białek kinetochoru. Metoda ta jednak nie może wykryć chromosomów zgubionych, ze względu na nieobecność kinetochoru na nieaktywnych centromerach. W tym przypadku należałoby się posłużyć hybrydyzacją *in situ* (ISH). Technika ta jest droższa i bardziej pracochłonna, ale dostarcza więcej informacji o rodzaju uszkodzenia. Na przykład sondy dla centromerów pozwalają na identyfikację nierozdzielnych chromosomów [4,14,15].

## 2.7. Mikrojądra w niedzielających się jednojądrowych komórkach

Określanie częstości występowania mikrojąder jedynie w limfocytach dwujądrowych po pierwszym podziale komórkowym nie uwzględnia ilości mikrojąder występujących w limfocytach, które nie uległy stymulacji podziałowej. A to one właśnie zawierają informację o ewentualnej ekspozycji organizmu na czynniki genotoksyczne i powinny być uwzględnione przy liczeniu mikrojąder w klasycznej metodzie bloku cytokinezy. Ocena częstości pojawiania się mikrojąder w jednojądrowych limfocytach może być źródłem dodatkowych informacji. Decydując się na ich uwzględnienie w analizowaniu wyników należy jednak pamiętać, że po stymulacji i zablokowaniu cytokinezy nieznanne jest pochodzenie komórek jednojądrowych znajdujących się wśród komórek dwujądrowych. Mogą one bowiem reprezentować te limfocyty, które: nie uległy podziałowi, zreplikowały DNA, ale uniknęły podziału jądra, podzieliły się, ale uniknęły zahamowania cytokinezy przez cytochalazynę B, nie uległy stymulacji podziałowej, gdyż znajdowały się we wczesnym stadium nekrozy bądź apoptozy. Pozostające po stymulacji mito-

genami komórki jednojądrowe z mikrojądrami mogą także mieć uszkodzony mechanizm podziałów jądrowych, a zatem nie są w stanie stać się komórkami dwujądrowymi.

Niezależnie od tych zastrzeżeń, szacowanie ilości mikrojąder w jednojądrowych komórkach najprawdopodobniej odzwierciedla uszkodzenia DNA powstałe w fazie G<sub>0</sub> limfocytów *in vivo*. Dokonywanie zatem oceny częstości występowania mikrojąder w komórkach jednojądrowych daje zatem informacje o niestabilności genetycznej, wynikającej z akumulacji uszkodzeń dokonującej się w ciągu życia w komórkach macierzystych i w krążących limfocytach; podczas gdy częstość występowania mikrojąder w dwujądrowych komórkach dodatkowo wskazuje na uszkodzenia, jakim uległy limfocyty w czasie ostatniego podziału [15].

### 3. MIKROJĄDRA W BADANIACH BIOMONITORINGOWYCH

Wzrost liczby pęknięć chromosomów czy liczby utraconych chromosomów jest dobrym wskaźnikiem podwyższonego ryzyka wystąpienia nie tylko nowotworów, ale także chorób degeneracyjnych związanych z wiekiem, takich jak na przykład choroba Alzheimera [8].

Metoda analizy mikrojąder przez zablokowanie cytokinezy jest wykorzystywana do biomonitoringu ludzkiej populacji, gdyż umożliwia:

- porównanie częstości występowania genetycznych uszkodzeń pomiędzy populacjami osób prowadzących różny styl życia czy uprawiających zawody o różnym stopniu zagrożenia zdrowia lub narażonych na działanie różnych czynników środowiska,
- ocenę osobniczej odpowiedzi gospodarza (np. płeć, wiek, styl życia),
- ocenę wrażliwości na promieniowanie pomagające w optymalizacji radioterapii,
- ocenę potencjalnej genotoksyczności związków nowoprowadzanych w przemyśle agrochemicznym i farmaceutycznym [20,21].

Zastosowanie tej metody wykazało, że częstość występowania mikrojąder wzrasta stopniowo z wiekiem osobników. W limfocytach kobiet jest w przybliżeniu 1,2–1,6 razy wyższa niż u mężczyzn pomiędzy 20. a 90. rokiem życia [4,12]. Także ilość mikrojąder wzrasta z niedoborem folianów, witaminy B12 i homocysteiny w organizmie [12]. Zaobserwowano, że wśród palaczy ilość mikrojąder była wyższa w porównaniu z badaną grupą niepalących [2,7]. Na podstawie obserwacji znacznej redukcji liczby mikrojąder po dużych dawkach witaminy C sugeruje się jej ochronne działanie na uszkodzenia wywołane bleomycyną [1].

#### 3.1. Mikrojądra jako biomarker w procesach nowotworowych

Wiele badań koncentruje się na wyjaśnianiu przyczyn występowania zwiększonego ryzyka pojawienia się chorób nowotworowych jedynie w pewnych populacjach. Ryzyko to, wynikające z genetycznego zróżnicowania populacji ludzkiej, jest odzwierciedleniem



polimorfizmu enzymów aktywacyjnych biorących udział w metabolizowaniu i detoksyfikacji karcinogenów i produktów ich metabolizmu. Efekt genotoksyczny jest często rezultatem różnej kombinacji aktywności enzymatycznych. Coraz częściej przedmiotem analizy są próby znalezienia zależności między częstością powstawania mikrojąder pod wpływem czynników genotoksycznych a polimorfizmami enzymów zaangażowanych w jego metabolizm [2,4,12]. Jako biomarkery wykorzystywane są także chromosomowe aberracje (CA), wymiana chromatyd siostrzanych (SCE), wykrywanie pęknięć nici DNA przez elektroforezę pojedynczych komórek w żelu agarozowym [3,6,7,24,25,29,30,33,34,35,36].

Mikrojądra mogą także być markerem zaburzeń w procesie naprawy uszkodzeń DNA. Świadczy o tym zwiększona ilość mikrojąder po zastosowaniu inhibitorów wypełniania luk nukleotydowych w czasie naprawy uszkodzeń przez wycinanie [13]. Wiele ostatnio publikowanych danych wskazuje na związek pomiędzy wzrostem częstości występowania mikrojąder a transformacją neoplastyczną [2,4,20].

Nie zawsze jednak wyniki badań epidemiologicznych potwierdzają związek pomiędzy zwiększoną liczbą mikrojąder a zagrożeniami nowotworowymi. Z opublikowanych przez Hagmara i wsp. [17] badań wynika na przykład, że największą wartość predykcyjną ryzyka chorób nowotworowych mają badania chromosomowych aberracji. Związku takiego nie zaobserwowali oni stosując jako biomarker zarówno wymianę chromatyd siostrzanych, jak i częstość pojawiania się mikrojąder w limfocytach.

### 3.2. Częstość występowania mikrojąder jako biomarker chorób degeneracyjnych

Analiza mikrojąder wykorzystywana jest jako wiarygodny biomarker nie tylko w badaniach nad zagrożeniami nowotworowymi. Prowadzone są też badania, w których wykorzystuje się metodę mikrojądrową w innych chorobach degeneracyjnych. Na przykład badania pacjentów z chorobą wieńcową naczyń sprawdzają, czy istnieje związek pomiędzy obecnością chromosomowych uszkodzeń w limfocytach krwi obwodowej a stopniem rozwoju miażdżycy. Stwierdzono, że obecność mikrojąder była znacznie wyższa w grupie pacjentów z udokumentowaną chorobą wieńcową w porównaniu z grupą kontrolną oraz że częstość występowania mikrojąder wzrasta wraz z ilością zmian miażdżycowych w naczyniach [5]. Jednym z czynników uważanym za czynnik ryzyka chorób naczyniowych i choroby Alzheimera jest zwiększone stężenie homo-cysteiny będącej bezpośrednim prekursorem metioniny. Wyższe stężenie homocysteiny w pożywce hodowlanej znacznie zwiększa częstość występowania mikrojąder w hodowanych limfocytach wskazując, że mógłby to być dobry biomarker uszkodzeń chromosomów w limfocytach *in vivo* wywołanych zaburzeniami w metabolizmie homocysteiny czy kwasu foliowego. Obecność mikrojąder była nieznacznie niższa, jeśli zamiast homocysteiny do pożywki hodowlanej dodano metioniny [8]. Badania na limfocytach pracowników narażonych na działanie kobaltu i metali ciężkich wskazują, że obecność mikrojąder może być także biomarkerem ekspozycji

na metale ciężkie. Nieznacznie podwyższony poziom mikrojąder i 8-hydroksydeoksyguaniny zaobserwowano u pracowników, którzy byli narażeni na pył zawierający metale ciężkie [9]. Mikrojądra jako biomarker genotoksyczności zostały także zastosowane w badaniach toksyczności pestycydów (alfa- i beta-endosulfanu) [13] i kwasu 2,4-dichlorofenoksyacetylowego [16]. Pilotowe badania byłych górników kopalni uranu narażonych na działanie radonu i częściej niż inne grupy zawodowe zapadających na raka płuc wykazały zwiększoną częstość aberracji chromosomowych w limfocytach krwi obwodowej [31]. Przeprowadzono także interesujące badania na limfocytach izolowanych z krwi obwodowej anestezjologów narażonych zawodowo na działanie tlenu azotu. Zaobserwowano znacznie wyższy poziom mikrojąder u kobiet niż u mężczyzn pracujących w tych samych warunkach. To zdaje się sugerować, że kobiety są bardziej wrażliwe na genotoksyczne efekty tlenu azotu. Nie odnotowano natomiast różnic między obydwoma grupami badając wpływ palenia papierosów na częstość występowania mikrojąder [28]. Również analiza mikrojąder została wykorzystana jako biomarker do wczesnego wykrywania uszkodzeń w komórkach szpiku kostnego i krwi obwodowej gryzoni eksponowanych na działanie genotoksycznych czynników środowiskowych [10].

Mikrojądra jako biomarker chorób neurodegeneracyjnych zostały sprawdzone w chorobie Parkinsona. Mimo że etiologia tej choroby jest ciągle nieznaną, coraz więcej dowodów wskazuje, że stres tlenowy odgrywa w jej rozwoju dużą rolę. Badane limfocyty pacjentów wykazują zarówno znacznie podniesioną ilość pęknięć DNA, oksydacyjnych uszkodzeń w zasadach purynowych, a także wielokrotnie większą częstość występowania mikrojąder [26].

### 3.3. Mikrojądra a polimorfizm genetyczny

W wielu pracach analizowano, w jakim stopniu wpływ polimorfizmu metabolicznego odzwierciedla się w biologicznych wskaźnikach ryzyka genotoksycznego w środowisku i miejscu pracy. Najczęściej badanymi metabolicznymi genotypami lub fenotypami były: ALDH2 (dehydrogenaza aldehydowa), CYP (P450 cytochrom), 1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP2D6, EPHX (epoksyhidrolaza), NAT2 (N-acetylotransferaza), GST (S-transferaza glutationu), M1, GSTT1 i GSTP1. Analizowanymi biomarkerami wczesnych efektów biologicznych były: aberracje chromosomowe CA, wymiana chromatyd siostrzanych SCE, mikrojądra MN, pomiar metodą kometową i mutacje w genie HPRT. Rezultaty badań wskazują na występowanie u zawodowych kominiarzy znacznie większej korelacji pomiędzy poziomem adduktów DNA a częstością występowania mikrojąder pozbawionych genu GST1 w limfocytach T niż limfocytach B [19]. Zbadano również ilość mikrojąder w limfocytach pracowników szklarni narażonych na działanie pestycydów. Oceniano wpływ genetycznego polimorfizmu genów: GSTM1, GSTT1 i NAT2. Częstość występowania mikrojąder była wyraźnie wyższa u palących pracowników szklarni o genotypie GSTM1 i NAT2. Wpływ genotypu był także skorelowany z wiekiem badanych i czasookresem ekspozycji na pestycydy. Zaobserwowano również u palaczy większą



ilość mikrojąder u osobników z GSTM1 i z NAT2 szybko acetylującym genotypem NAT2 [11]. Rezultaty te są jednak sprzeczne z tymi, które otrzymano badając wpływ tych polimorfizmów na aberracje chromosomowe. Autorzy sugerują, że obydwie typy biomarkerów odzwierciedlają inny typ uszkodzeń genotoksycznych. Przeprowadzono również epidemiologiczne badania nad wpływem GSTM1 na wrażliwość na choroby związane ze stresem tlenowym. Limfocyty z nieaktywnym genotypem GSTM1 w porównaniu z limfocytami kontrolnymi nie wykazywały zwiększonej wrażliwości, wyrażonej częstością powstawania mikrojąder, na benzoapiren [27]. Szereg badań, w których biomarkerami są mikrojądra, a także komety, w porównaniu z zastosowaniem aberracji chromosomowych, wskazują bądź na zbyt małą ich czułość na wielkość ekspozycji na genotoksyczne czynniki środowiskowe czy zawodowe lub na różnice w mechanizmie uszkodzeń [6,29,30,33,36].

## PODSUMOWANIE

Nie znamy do tej pory jednego uniwersalnego biomarkera, a obserwowane często rozbieżności w genotoksyczności ocenianej przy pomocy różnych biomarkerów skłaniają do poszukiwania nie tylko nowych biomarkerów, ale także do znalezienia przyczyny odpowiedzialnej za te różnice. Coraz większą popularnością cieszy się metoda oceny mikrojąder. W porównaniu z klasycznymi metodami cytogenetycznymi jest znacznie łatwiejsza, tańsza i wymaga mniej czasu na przeanalizowanie większej liczby komórek, a przy tym jest równie czuła jak metoda analizy chromosomów z płytki metafazowej. Zalety te czynią ją niezwykle przydatną w prowadzonych na dużych populacjach badaniach epidemiologicznych oceniających stopień narażenia na czynniki genotoksyczne. Ocena częstości powstawania mikrojąder po stymulacji limfocytów i zahamowaniu cytokinezy wydaje się być dobrym biomarkerem wczesnego wykrywania zagrożeń chorobami nowotworowymi oraz degeneracyjnymi. Mikrojądra reprezentują inny typ uszkodzeń niż te, które odpowiedzialne są za powstawanie aberracji chromosomowych. Może to być jedną z istotnych przyczyn rozbieżności w rezultatach otrzymywanych obydwoma metodami. Mikrojądra pochodzą bowiem nie tylko z pękniętych chromosomów, ale także z zaburzeń w segregacji chromosomów. Ponadto, jak sugerują Falck i wsp. [11], pewne czynniki genotoksyczne indukują zmiany w składzie subpopulacji limfocytów. Różne subpopulacje reagują w inny sposób zarówno na stymulację mitogenem, jak i na hamowanie cytokinezy cytochalazyną B. To w konsekwencji może prowadzić do różnic w częstości powstawania mikrojąder.

Poszerzanie wiedzy na temat mechanizmu tworzenia się mikrojąder, a także wystandaryzowanie metody umożliwi jej stosowanie jako wiarygodnego biomarkera.

## LITERATURA

- [1] ANDERSON D, PHILLIPS BJ. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 1999; **37**: 1015–1025.
- [2] AU WW, CAJAS-SALAZAR N, SALAMA S. Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutation Res* 1998; **400**: 467–478.
- [3] BERWICK M, VINEIS P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 874–897.
- [4] BONASSI S, FENECH M, LANDO C, LIN YP, CEPPI M, CHANG WP, HOLLAND N, KRISCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, JIA C, GIORGIO M, FERGUSON LR, FUCIC A, LIMA OG, HRELIA P, KIRSHNAJA AP, LEE TK, MIGLIORE L, MIKHALEVICH L, MIRKOVA E, MOESSO P, MULLER WU, ODAGIRI Y, SCARFFI MR, SZABOVA E, VOROBTSOVA I, VRAL A, ZIJNO A. Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ and Molecular Mutagen* 2001; **37**: 31–45.
- [5] BOTTO N, RIZZA A, COLOMBO MG, MAZZONE AM, MANFREDI S, MASETTI C, CLERICO A, BIAGINI A, ANDREASSI MG. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat Res* 2001; **493**: 23–30.
- [6] CARSTENSEN U, HOU SM, ALEXANDRIE AK, HOGSTEDT B, TAGESSON C, WARHOLM M, RANNUG A, LAMBERT B, AXMON A, HAGMAR L. Influence of genetic polymorphisms of biotransformation enzymes on gene mutations, strand breaks of deoxyribonucleic acid, and micronuclei in mononuclear blood cells and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in potroom workers exposed to polyaromatic hydrocarbons. *Scand J Work Environ Health* 1999; **25**: 351–360.
- [7] CHENG TJ, CHRISTIANI DC, XU X, WAIN JC, WIENCKE JK, KELSEY KT. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res* 1996; **349**: 43–50.
- [8] CROTT J, FENECH M. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes *in vitro*. *Mutagenesis* 2001; **16**: 213–217.
- [9] DE BOECK M, LARDAU S, BUCHET JP, KIRSCH-VOLDERS M, LISON D. Absence of significant genotoxicity in lymphocytes and urine from workers exposed to moderate levels of cobalt-containing dust: a cross-sectional study. *Environ Mol Mutagen* 2000; **36**: 151–160.
- [10] DE SOUZA BUENO A M, DE BRAGANCA PEREIRA CA, RABELLO-GAY MN. Environmental genotoxicity evaluation using cytogenetic end points in wild rodents. *Environ Health Perspect* 2000; **108**: 1165–1169.
- [11] FALCK GC, HIRVONEN A, SCARPATO R, SAARIKOSKI ST, MIGLIORE L, NORPPA H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 1999; **441**: 225–237.
- [12] FENECH M, HOLLAND N, CHANG WP, ZEIGER E, BONASSI S. The Human MicroNucleus Project – an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Res* 1999; **428**: 271–283.
- [13] FENECH M, NEVILLE S. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1992; **19**: 27–36.
- [14] FENECH M. The cytokinesis-block micronucleus technique. *Technologies for detection of DNA damage and mutations* 1996; 25–36.
- [15] FENECH M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Res* 2000; **455**: 81–95.
- [16] FIGGS LW, HOLLAND NT, ROTHMANN N, ZAHM SH, TARONE RE, HILL R, VOGT R F, SMITH MT, BOYSEN CD, HOLMES FF, VANDYCK K, BLAIR A. Increase lymphocyte replicative index following 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide exposure. *Cancer Causes Control* 2000; **11**: 373–389.
- [17] HAGMAR L, STROMBERG U, TINNERBERG H, MIKOCZY Z. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int J Hyg Environ Health* 2001; **204**: 43–47.
- [18] HEDDLE JA. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat Res* 1973; **18**: 187–192.
- [19] ICHIBA M, HAGMAR L, RANNUG A, HOGSTEDT B, ALEXANDRIE AK, CARSTENSEN U, HEMMINKI K. Aromatic DNA adducts, micronuclei and genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 in chimney sweeps. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 1347–1352.
- [20] KIRSCH-VOLDERS M, FENECH M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 2001; **16**: 51–58.
- [21] KIRSCH-VOLDERS M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res* 1997; **392**: 1–4.



- [22] KRISHNA G, HAYASHI M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Res* 2000; **455**: 155–166.
- [23] KRUSZEWSKI M, IWANEŃKO T, BOUZYK E, SZUMIEL I. Chelating of iron and copper alters properties of DNA in L5178Y cells, as revealed by the comet assay. *Mutation Res* 1999; **434**: 53–60.
- [24] KRUSZEWSKI M, WOJEWÓDZKA M, IWANEŃKO T. Test kometkowy. 1 Teoria i praktyka. *Raporty IChTJ. Seria B* 1996; **1**: 1–17.
- [25] LU Y, MORIMOTO K, TAKESHITA T, TAKEUCHI T, SAITO T. Genotoxic effects of alpha-endosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells. *Environ Health Perspect* 2000; **108**: 559–561.
- [26] MIGLIORE L, SCARPATO R, COPPEDE F, PETROZZI L, BONUCCELLI U, RODILLA V. Chromosome and oxidative damage biomarkers in lymphocytes of Parkinson's disease patients. *Int J Hyg Environ Health* 2001; **204**: 61–66.
- [27] ONARAN I, GUVEN G, OZAYDIN A, ULUTIN T. The influence of GSTM1 null genotype on susceptibility to *in vitro* oxidative stress. *Toxicology* 2001; **157**: 195–205.
- [28] PASQUINI R, SCASSELLATI-SFORZOLINI G, FATIGONI C, MARCARELLI M, MONARCA S, DONATO F, CENCETTI S, CERAMI F M. Sister chromatid exchanges and micronuclei in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to enflurane and nitrous oxide. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001; **20**: 119–126.
- [29] PAVANELLO S, CLONFERO E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat Res* 2000; **463**: 285–308.
- [30] PAVANELLO S, CLONFERO E. Biomarkers of genotoxic risk and metabolic polymorphism. *Med Lav* 2000; **91**: 431–461.
- [31] POPP W, PLAPPERT U, MULLER WU, REHN B, SCHNEIDER J, BRAUN A, BAUER PC, VAHRENHOLZ C, PRESEK P, BRAUKSIEPE A, ENDERLE G, WUST T, BRUCH J, FLIEDNER TM, KONIETZKO N, STREFFER C, WOITOWITZ H J, NORPOTH K. Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study. *Radiat Environ Biophys* 2000; **39**: 275–282.
- [32] SCHMID W. The micronucleus test. *Mutation Res* 1975; **31**: 9–15.
- [33] SRAM RJ, BINKOVA B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens. *Environ Health Perspect* 2000; **108**: 57–70.
- [34] SRAM RJ. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. *Environ Health Perspect* 1998; **106**: 231–239.
- [35] SRAM RJ, ROSSNER P, PELTONEN K, PODRAZILOVA K, MRACKOVA G, DEMOPOULOS NA, STEPHANOOU G, VLACHODIMITROPOULOS D, DARROUDI F, TATES AD. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1, 3-butadiene-exposed workers. *Mutation Res* 1998; **419**: 145–154.
- [36] VAN DELFT JH, STEENWINKEL MS, VAN ASTEN JG, DE VOGEL N, BRUIJNTJES-ROZIER TC, SCHOUTEN T, CRAMERS P, MAAS L, VAN HERWIJNEN MH, VAN SCHOOTEN F, HOPMANS PM. Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Ann Occup Hyg* 2001; **45**: 395–08.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 04.01.2002 r.

Przyjęto: 15.02.2002 r.

Adres autora: 30-387 Kraków, ul. Gronostajowa 7

e-mail: mkapisz@if.uj.edu.pl



# IMPORT BIAŁKA DO MITOCHONDRIÓW

## PROTEIN IMPORT INTO MITOCHONDRIA

Małgorzata WOJTKOWSKA

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

**Streszczenie:** Większość białek mitochondrialnych importowana jest z cytoplazmy. Podstawową rolę w tym procesie odgrywają kompleksy białkowe zlokalizowane w zewnętrznej i wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Są to translokaza błony zewnętrznej (kompleks TOM) i translokazy błony wewnętrznej (kompleksy TIM). Ich składniki rozpoznają importowane białka, jak i umożliwiają ich translokację przez błony lub ich wbudowanie w błony. Dynamiczna natura obu typów translokaz pozwala na sortowanie białek o odmiennych mechanizmach importu. Poza tym istotną rolę w imporcie odgrywają białka zlokalizowane w cytoplazmie, przestrzeni międzybłonowej i matriks mitochondrialnej. Zakłócenia w imporcie białka do mitochondriów mogą stanowić przyczynę nowej klasy chorób pochodzenia mitochondrialnego, co potwierdza kluczowe znaczenie procesu importu białka dla prawidłowego działania mitochondriów.

**Słowa kluczowe:** import białka, kompleks TOM, kompleks TIM, mitochondria

**Summary:** Mitochondria import majority of their proteins from the cytosol. The recognition and translocation across the mitochondrial membranes are supported by dynamic protein complexes termed the translocase of the outer membrane (the TOM complex) and translocase of inner membrane (the TIM complex). The translocases consist of receptor proteins and proteins involved in protein translocation. The dynamic nature of both membrane translocases permits sorting of preproteins at distinct stages of the import pathway. Essential factors in protein import are also cytosol, intermembrane space and matrix proteins. The link between mitochondrial import defects and some of the neurological diseases is crucial to explanation of their molecular bases.

**Key words:** protein import, TOM complex, TIM complex, mitochondria



## WPROWADZENIE

Mitochondria to organelle odgrywające centralną rolę w metabolizmie energetycznym komórki, a więc procesy kluczowe dla ich funkcjonalności mają zasadnicze znaczenie dla możliwości przeżycia komórki. Do procesów takich zalicza się import białka, bowiem większość białek mitochondrialnych kodowana jest przez geny jądrowe i syntetyzowana w cytoplazmie [48]. Obecnie dostępne dane wskazują, iż import białka do mitochondriów może być procesem zarówno potranslacyjnym, jak i kotranslacyjnym [18,40]. Import białka do mitochondriów może zachodzić różnymi drogami i przy wykorzystaniu różnych mechanizmów. Istnieją jednak wspólne warunki determinujące możliwość skierowania danego białka do mitochondriów. Są to:

- (i) prawidłowe funkcjonowanie maszynerii translokującej zlokalizowanej w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (kompleks TOM, z ang. *the translocase of outer membrane*) i wewnętrznej błonie mitochondrialnej (kompleksy TIM, ang. *the translocases of inner membrane*);
- (ii) rozfałdowanie, przynajmniej częściowe, importowanego białka, gwarantowane przez cytozolowe i matriksowe białka opiekuńcze, głównie z rodziny Hsp, nazywane też białkami szoku termicznego [49,70];
- (iii) rozpoznanie importowanego białka dzięki istnieniu w jego obrębie sekwencji kierującej.

Charakter i lokalizacja sekwencji kierującej zależą w dużym stopniu od miejsca przeznaczenia importowanego białka. W przypadku białek kierowanych do matriks mitochondrialnej sekwencja kierująca to tak zwana presekwencja, czyli znajdująca się na końcu aminowym sekwencja obejmująca od 15 do 40 reszt aminokwasowych, w większości obdarzonych ładunkiem dodatnim i usuwana w procesie dojrzewania białka. Zdolność do tworzenia przez presekwencję struktury amfipatycznej  $\alpha$  helisy wydaje się być bardzo istotna dla pełnionej przez nią funkcji [55]. Białka kierowane do błon mitochondrialnych, a także niektóre białka przestrzeni międzybłonowej zawierają sekwencję kierującą innego typu. Jest ona zlokalizowana w obrębie dojrzałej postaci łańcucha polipeptydowego i może mieć różny charakter. W przypadku niektórych białek importowanych do mitochondriów wyróżnia się również tzw. sekwencje sortujące, które stanowią dodatkowy sygnał o miejscu przeznaczenia białka umieszczony za sekwencją kierującą.

Pierwsze prace nad złożonym zagadnieniem importu białka do mitochondriów prowadzono na mikroorganizmach, takich jak: *Neurospora crassa* i *Saccharomyces cerevisiae*. Mikroorganizmy te stanowią obecnie materiał modelowy w badaniach nad budową aparatu importu białka, jak i nad mechanizmami tego procesu w przypadku mitochondriów organizmów bardziej złożonych, takich jak rośliny [10,26,48, 54,68,71] i ssaki, w tym człowiek [63,49,52,72]. Stąd, dane uzyskiwane w badaniach importu białka do mitochondriów tych organizmów odnosi się zawsze do wzorca, za jaki uznano mitochondria *S. cerevisiae* i *N. crassa*.



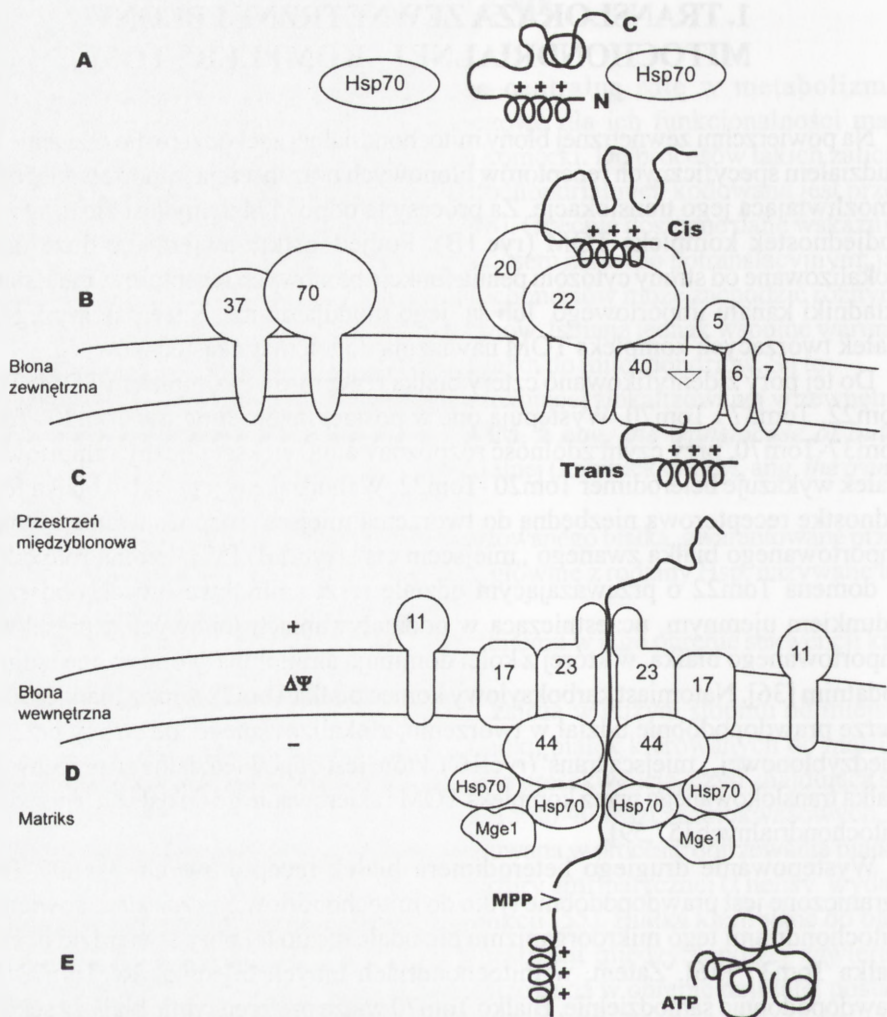
## 1. TRANSLOKAZA ZEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNEJ – KOMPLEKS TOM

Na powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej zachodzi rozpoznawanie białek z udziałem specyficznych receptorów błonowych oraz insercja importowanego białka umożliwiająca jego translokację. Za procesy te odpowiedzialny jest złożony z wielu podjednostek kompleks TOM (ryc.1B). Podjednostki zawierające duże domeny zlokalizowane od strony cytozolu pełnią funkcję błonowych receptorów, inne stanowią składniki kanału importowego lub są jego modulatorami. Nazwy poszczególnych białek tworzących kompleks TOM nawiązują do ich mas cząsteczkowych.

Do tej pory zidentyfikowano cztery białka receptorowe kompleksu TOM: Tom20, Tom22, Tom37 i Tom70. Występują one w postaci heterodimerów Tom20 -Tom22 i Tom37-Tom70, przy czym zdolność rozpoznawania większej liczby importowanych białek wykazuje heterodimer Tom20 -Tom22. Wchodzące w jego skład białka formują jednostkę receptorową niezbędną do tworzenia miejsca rozpoznawania i wiązania importowanego białka zwanego „miejscem cis” (ryc.1B) [57]. Istotną rolę odgrywa tu domena Tom22 o przeważającym udziale reszt aminokwasowych obdarzonych ładunkiem ujemnym, uczestnicząca w oddziaływaniach jonowych z presekwencją importowanego białka, w której z kolei dominują aminokwasy obdarzone ładunkiem dodatnim [36]. Natomiast karboksylowy koniec białka Tom22 wraz z białkiem Tom40 bierze prawdopodobnie udział w tworzeniu, zlokalizowanego od strony przestrzeni międzybłonowej, „miejsca trans” (ryc.1C), które jest odpowiedzialne za przechwycenie białka translokowanego przez kompleks TOM i skierowanie go do dalszych przedziałów mitochondrialnych [57,59].

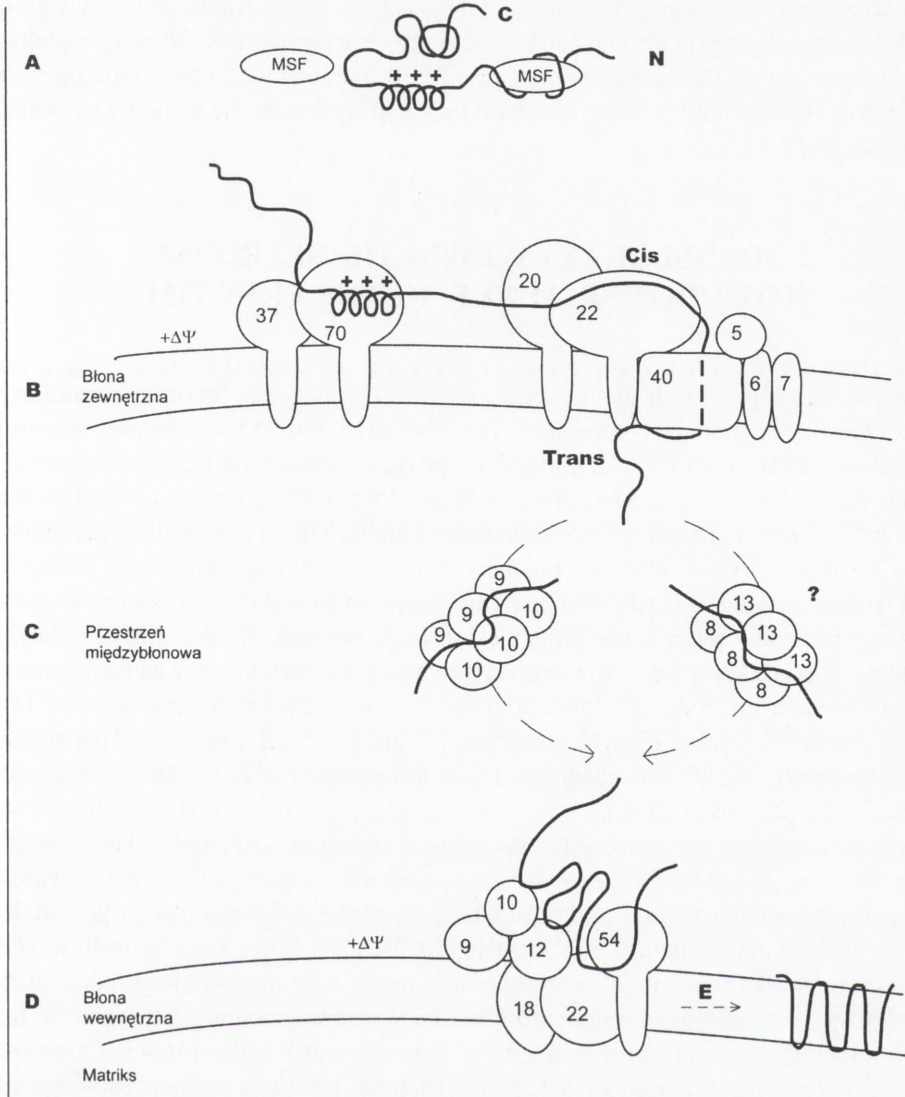
Występowanie drugiego heterodimeru białek receptorowych, Tom37-Tom70, ograniczone jest prawdopodobnie tylko do mitochondriów *S.cerevisiae*, bowiem poza mitochondriami tego mikroorganizmu nie udało się do tej pory stwierdzić obecności białka Tom37 [56]. Zatem, w mitochondriach innych organizmów Tom70 działa prawdopodobnie samodzielnie. Białko Tom70 wiąże preferencyjnie białka z sekwencją kierującą zlokalizowaną w obrębie łańcucha polipeptydowego [28,16,17] (ryc.2B). Należą do nich białka kierowane do błony wewnętrznej, w tym translokaza nukleotydów adeninowych i przenośnik fosforanowy [62]. Białka rozpoznawane przez Tom70 kierowane są do heterodimeru Tom20-Tom22, skąd mogą być transportowane dalej (ryc.2B). Innym białkiem receptorowym kompleksu TOM scharakteryzowanym jedynie u drożdży *S. cerevisiae* jest Tom71 [65]. Jego sekwencja aminokwasowa jest w 53% identyczna z występującą w przypadku białka Tom70. Ponieważ obecność Tom71 nie jest konieczna dla importu białek z sekwencjami kierującymi rozpoznawanymi przez Tom70, białko to, choć biochemicznie podobne, pełni jednak odmienne funkcje. Uczestniczy ono prawdopodobnie w oddziaływaniach mitochondriów z białkami komórkowymi, na przykład białkami cytoszkieletu [65].

Białka rozpoznane i związane przez receptory kompleksu TOM zostają następnie skierowane do kanału importowego kompleksu TOM. Kanał ten tworzony jest przez białko Tom40 [24], a jego aktywność modulowana jest przez Tom22 i białka Tom 0



RYCINA 1. Import białka do matryks – etapy: A – prekursorowa postać białka z presekwencją na końcu aminowym – rozfałdowanie białka, B – kompleks TOM, oddziaływanie z receptorami Tom20 Tom22 i translokacja przez kanał importowy, C – wiązanie w miejscu „trans”, D – kompleks Tim17-Tim23 – translokacja przez błonę wewnętrzną z udziałem  $\Delta\Psi$ , ATP, Hsp70 i Mge1, E – odcięcie presekencji przez peptydazę MPP i dojrzewanie białka





RYCINA 2. Schemat importu translokazy nukleotydów adeninowych do błony wewnętrznej – etapy: A – prekursorowa postać translokazy - rozfałdowanie z udziałem czynnika MSF, B – kompleks TOM, oddziaływanie z receptorami Tom37-Tom70, przekazanie białka do kanału importowego poprzez oddziaływanie z drugim heterodimerem Tom20-Tom22, C – udział białek Tim przestrzeni międzybłonowej w przekazywaniu translokazy do kompleksu błony wewnętrznej, D – kompleks Tom22-Tom54, E – zależne od  $\Delta\Psi$  wbudowanie białka w błonę

małej masie cząsteczkowej, czyli Tom5 [11,14], Tom6 i Tom7. Kanał importowy wraz z białkami modulującymi aktywność kanałową tworzą łącznie tzw. rdzeń kompleksu TOM (z ang. *the TOM core complex*) [3,37,60], nazywany również główną porą importową – GIP (z ang. *general insertion pore*), który uważa się za natywny kanał importowy [2,12,24, 58].

## 2. TRANSLOKAZY WEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNEJ – KOMPLEKSY TIM

Wewnętrzna błona mitochondrialna zawiera dwa odrębne aparaty translokacji białka. Jednym z nich jest kompleks Tim17-Tim23 [50,41], nazywany również kompleksem TIM23 [6] (ryc.1D), który rozpoznaje białka zawierające sekwencję kierującą do matriks, czyli typową presekwencję. Oprócz wyżej wymienionych białek, kompleks ten zawiera peryferyczne, hydrofilowe białko Tim44 oraz białka opiekuńcze mtHsp70 i Mge1 (czynnik wymiany nukleotydów), wspomagające aktywność mtHsp70 (ryc.1D) (patrz rozdz. 4). Tim17, Tim23 i Tim44 występują w ilościach ekwimolowych, podczas gdy ilość mtHsp70 jest trzydziestokrotnie wyższa. Białka Tim44 i Tim23 zawierają powtarzający się motyw heptaleucynowy odpowiedzialny za formowanie struktury suwaka leucynowego, która odgrywa istotną rolę w ich dimeryzacji (ryc.1D) [66]. W przeciwieństwie do Tim44, dimeryzacja Tim23 jest ściśle zależna od potencjału błony wewnętrznej ( $\Delta\Psi$ ) oraz obecności translokowanego białka [8]. W nieobecności  $\Delta\Psi$ , białko Tim23 tworzy dimer i wówczas tworzony przez to białko kanał importowy w błonie wewnętrznej jest zamknięty. Natomiast w obecności  $\Delta\Psi$ , białko Tim23 wiąże się z presekwencją translokowanego białka, co prowadzi do dysocjacji dimeru i otwarcia kanału. Presekwencja zostaje przeniesiona przez błonę, ale translokacja pozostałej części białka wymaga udziału białek mtHsp70, Tim44 i Mge1 oraz hydrolizy ATP. Wymienione białka działają jak kontrolowany przez ATP molekularny mechanizm „zapadkowy” dla kolejnych segmentów białka wyłaniających się z kanału. W ten sposób wspólnie stanowią one „siłę ciągnącą” translokowane białko [46,47]. Obecność potencjału błonowego zapobiega zwrotnemu ruchowi łańcucha polipeptydowego, aż do momentu włączenia w matriks białka mtHsp70. Wówczas proces translokacji białka do matriks staje się nieodwracalny [19] (ryc.1E). W ostatnich latach zostały sformułowane dwa modele wyjaśniające funkcję białka mtHsp70 w procesie translokacji importowanego białka przez błonę. Według modelu „zapadki” Browna nazywanego również modelem pułapki (z ang. *Brownian ratchet lub trapping model*) przejście łańcucha polipeptydowego przez kanał importowy odbywa się na zasadzie kontrolowanej zapadki. Mechanizm ten zależny jest od spontanicznych ruchów rozfałdowujących translokowaną część białka znajdującą się po cytozolowej stronie błony. Kiedy część ta jest luźno sfałdowana, wówczas białko może zostać przeniesione i dalej wiązać się z mtHsp 70, co zapobiega jego cofaniu [19]. Natomiast model siły

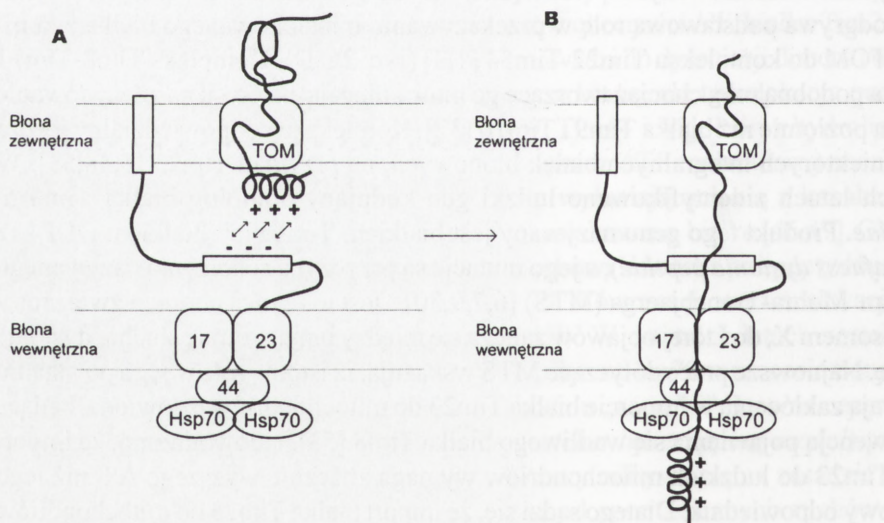


translokującej (z ang. *pulling model* lub *translocation motor model*) zakłada, że białko mtHsp70 spełnia w imporcie aktywną rolę motoru poprzez wpływ na stopień roz-fałdowania importowanego białka. Oznacza to, że białko mtHsp70 odpowiedzialne jest za przeprowadzenie konformacyjnych zmian prowadzących do wciągnięcia polipeptydu przez błony do matriks [70,43]. Sprzężenie między kanałem importowym i białkami umożliwiającymi całkowitą translokację importowanego białka do matriks powstaje dzięki oddziaływaniom między białkami Tim23 i Tim44, które jest zależne od ATP [45,66] (ryc.1D). Do kompleksu Tim23-Tim17 zalicza się także białko Tim11. Jednakże stanowi ono równocześnie podjednostkę  $F_1F_0$  ATP-azy, a jego rola w działaniu kompleksu Tim17-Tim23 jest nadal niejasna i przez niektórych autorów wykluczana [5].

Druga translokaza wewnętrznej błony nazywana jest kompleksem Tim22-Tim54 lub kompleksem TIM22 [28]. Jest ona zbudowana z integralnych białek błonowych Tim54, Tim22 i Tim18 [7,29] oraz peryferycznego białka Tim12 [31] (ryc.2D). Kompleks Tim54-Tim22, w przeciwieństwie do kompleksu Tim17-Tim23, nie wykazuje aktywności kanałowej. Importowane przez ten kompleks białka uwalniane są bezpośrednio do błony w sposób zależny od  $\Delta\Psi$ . Są to głównie białka kierowane do błony wewnętrznej charakteryzujące się sekwencją kierującą zlokalizowaną w obrębie ich dojrzałej postaci [16,17]. Należą do nich, na przykład, przenośnik fosforanowy, translokaza nukleotydów adeninowych oraz białka Tim23, Tim22 i Tim17. Istotną rolę w funkcjonowaniu kompleksu Tim22-Tim54 odgrywają oddziaływania z białkami przestrzeni międzybłonowej: Tim8, Tim9, Tim10 i Tim13 [1,33,67]. Białka te tworzą dwa kompleksy: Tim9-Tim10 i Tim8-Tim13 [6,32] (ryc. 2C). Dzięki oddziaływaniom z peryferycznie zlokalizowanym w wewnętrznej błonie białkiem Tim12, kompleks Tim9-Tim10 odgrywa podstawową rolę w przekazywaniu translokowanego białka z kompleksu TOM do kompleksu Tim22-Tim54 [1,3] (ryc. 2C,D). Kompleks Tim8-Tim13 odgrywa podobną rolę, chociaż tworzące go białka ulegają ekspresji na zdecydowanie niższym poziomie niż białka Tim9 i Tim10 [32]. Komleks ten odpowiedzialny jest za import niektórych integralnych białek błonowych, na przykład Tim23 [6,38,53]. W ostatnich latach zidentyfikowano ludzki gen kodujący homolog białka Tim8 *S. cerevisiae*. Produkt tego genu nazywany jest białkiem Tim8a lub białkiem DDP1 (z ang. *deafness dystonia peptide*), a jego mutacje są przyczyną schorzenia nazywanego zespołem Mohra-Tranebjaerga (MTS) [6,7,9,30]. Jest to rzadka choroba związana z chromosomem X, do której objawów zalicza się między innymi utratę słuchu, dystonię i ślepotę. Najnowsze prace dotyczące MTS wskazują, iż istotną rolę w jego powstaniu odgrywają zakłócenia w imporcie białka Tim23 do mitochondriów człowieka, będące konsekwencją pojawienia się wadliwego białka Tim8 [53]. Udowodniono, że import białka Tim23 do ludzkich mitochondriów wymaga znacznie wyższego  $\Delta\Psi$  niż jego drożdżowy odpowiednik. Dlatego sądzi się, że import białka Tim23 do mitochondriów człowieka jest prawdopodobnie, bardziej niż u drożdży, zależny od obecności i prawidłowego działania heterooligomeru Tim8-Tim13.

### 3. KOMPLEKSY TOM I TIM – RAZEM CZY OSOBNO?

Istnieją dwa modele wyjaśniające oddziaływania między błonami mitochondrialnymi podczas translokacji importowanego białka. Pierwszy oparto na założeniu o istnieniu jednego rodzaju aktywności łączącej obie błony i tworzącej nieprzerwany, szczelny kanał, łączący cytozolową stronę zewnętrznej błony z matriks [51]. Według drugiego modelu [56], kompleksy w obu błonach przeznaczone są do pełnienia odrębnych funkcji. Stanowią one niezależne aparaty translokacji, które podczas importu do mitochondriów współdziałają ze sobą w miejscach kontaktowych między błonami. Badania ostatnich lat dowodzą słuszności drugiego modelu. Istnienie odrębnych aktywności w obu błonach mitochondrialnych zostało między innymi poparte wynikami badań nad importem pęcherzyków tworzonych przez błony zewnętrzne oraz mitoplastów [44]. Ostatnio stwierdzono, iż istotną rolę w tworzeniu miejsc kontaktowych obu błon mitochondrialnych i współdziałaniu translokaz odgrywa białko Tim23 [15]. Jest to białko zlokalizowane w błonie wewnętrznej, ale jego koniec aminowy znajduje się w błonie zewnętrznej (ryc.3A). Dzięki takiemu rozmieszczeniu białka Tim23, w przestrzeni międzybłonowej znajduje się jego naładowana ujemnie domena rozpoznająca presekwencję białka związanego wcześniej przez kompleks TOM. Oddziaływania między tą domeną Tim23 i presekwencją prowadzą do odłączenia się importowanego białka od błony zewnętrznej i jego skierowania do kompleksu Tim17-Tim23 (ryc. 3B). Zatem, Tim23 łącząc błony mitochondrialne zasadniczo zwiększa efektywność importu



RYCINA 3. Białko Tim23 jako łącznik obu błon mitochondrialnych. Na rycinie przedstawiono kompleks Tim17-Tim23 jako monomer: A – wiązanie presekwencji w miejscu „trans” i oddziaływanie z domeną białka Tim23, B – skierowanie białka do kanału błony wewnętrznej.



białka do mitochondriów. Rolę łącznika błon mitochondrialnych dla białek translokowanych przez drugą translokazę błony wewnętrznej (kompleks Tim22-Tim54) pełnią współdziałające z nią białka przestrzeni międzybłonowej: Tim9, Tim10, Tim8, Tim13 (patrz rozdz. 2).

#### 4. CYTOPLAZMATYCZNE I MATRIKSOWE BIAŁKA OPIEKUŃCZE

Funkcja białek opiekuńczych w procesie importu białka do mitochondriów jest złożona. Znajdujące się w cytoplazmie białka opiekuńcze zapobiegają agregacji nowosyntetyzowanego białka, a także jego fałdowaniu, uniemożliwiającemu translokację przez błonę. Do białek tych zalicza się czynnik MSF (z ang. *mitochondrial import stimulating factor*) i białka Hsp70 (z ang. *heat shock protein*). Co ciekawe, wykazują one różne preferencje względem białek rozpoznawanych przez heterodimery receptorowe kompleksu TOM. Czynnik MSF oddziałuje z białkami rozpoznawanymi przez heterodimer Tom37-Tom70, podczas gdy białko Hsp70 wspomaga import białek rozpoznawanych przez heterodimer Tom20-Tom22 (ryc.1A) [49,56,73]. W białkach Hsp70 wyróżnia się dwie funkcjonalne domeny: pierwsza, zlokalizowana na aminowym końcu, odpowiedzialna jest za wiązanie ATP, natomiast druga, zlokalizowana na końcu karboksylowym, wiąże substrat, którym jest importowane białko. Domena wiążąca ATP jest wysoce konserwatywna, podczas gdy domena wiążąca substrat wykazuje większe zróżnicowanie sekwencji.

Znajdujące się w matriks mitochondrialnej białka opiekuńcze uczestniczą w różnych etapach importu białka. Białko mtHsp70 bierze udział w zależnym od ATP mechanizmie odpowiedzialnym za prawidłową translokację importowanego białka (patrz rozdz. 2). Białko wprowadzone do matriks podlega działaniu peptydazy MPP (ang. *mitochondrial processing peptidase*), która odcina sekwencję kierującą. Natępnie białko może zostać przekazane do dwóch kolejnych białek opiekuńczych. Są to mtHsp60, nazywane również białkiem Cpn60 oraz mthsp10, nazywane również białkiem Cpn10 [49]. Białka te wraz z mtHsp70 biorą udział w fałdowaniu zaimportowanego białka i jego włączeniu w większe kompleksy.

#### 5. SZLAKI IMPORTU BIAŁKA

##### 5.1. Import do matriks mitochondrialnej

Białka importowane do matriks mitochondrialnej charakteryzują się obecnością sekwencji kierującej na końcu aminowym. Jest to tak zwana presekwencja (patrz Wprowadzenie). Jak wcześniej wspomniano (rozd. 1), import białka do matriks

rozpoczyna się odczytaniem presekwencji przez heterodimer receptorowy kompleksu TOM, tworzony przez białka Tom20 i Tom22 (ryc.1). Po związaniu z receptorami importowane białko zostaje skierowane do kanału importowego kompleksu TOM, co umożliwi jego translokację do przestrzeni międzybłonowej. W dalszych etapach importu białka do matriks uczestniczy kompleks Tim17-Tim23 (patrz rozdz. 2). Import białka do matriks zależy od obecności potencjału błonowego i hydrolizy ATP, zasilającej działanie białek opiekuńczych (rozdz. 4). Odcięcie presekwencji przez zlokalizowaną w matriks peptydazę MPP zapoczątkowuje proces przyjmowania przez białko docelowej struktury (patrz rozdz. 4).

## 5.2. Import do wewnętrznej błony mitochondrialnej

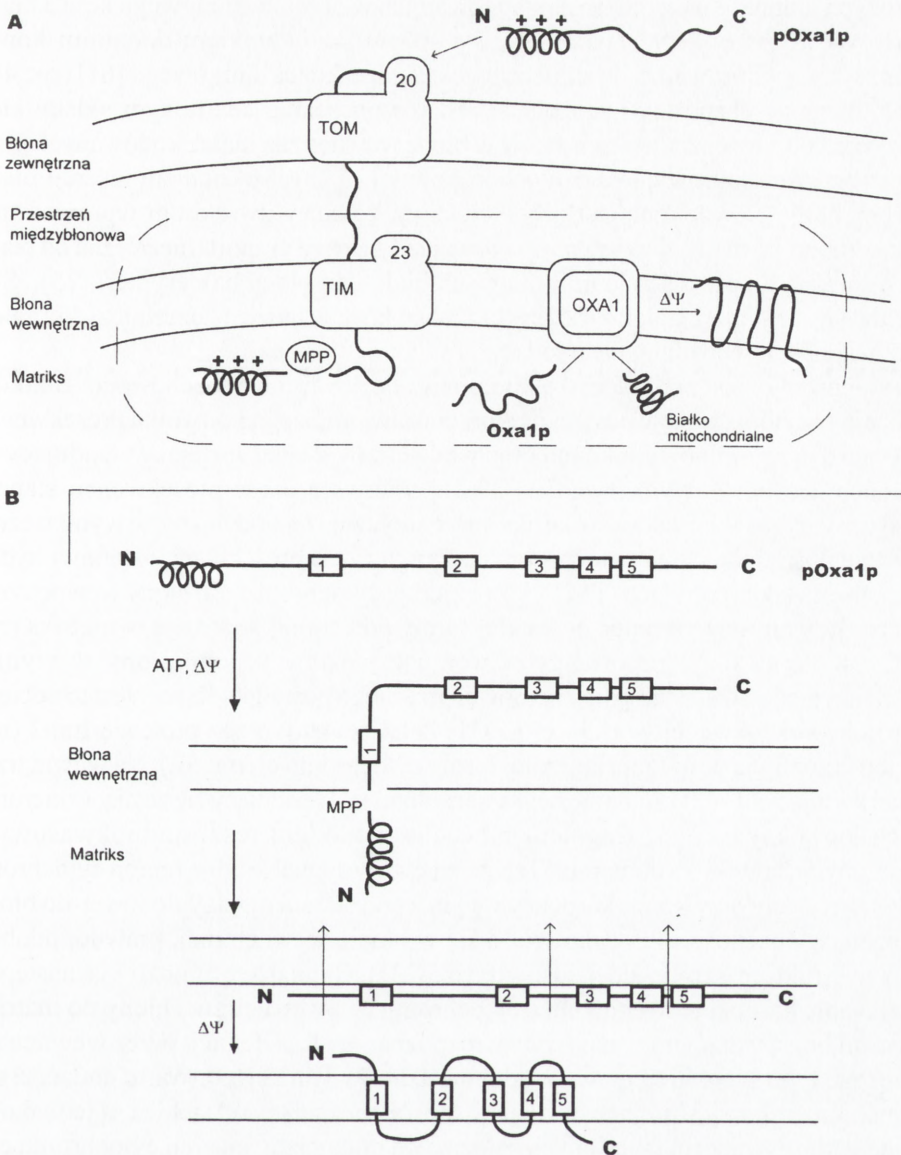
Import białek kierowanych do wewnętrznej błony przebiega trzema różnymi drogami. Poniżej, przedstawiono każdą z tych dróg posługując się opisem importu odpowiedniego białka mitochondrialnego. Są to:

- (i) import translokazy nukleotydów adeninowych;
- (ii) eksport białka Oxa1;
- (iii) import cytochromu  $c_1$ .

Translokaza nukleotydów adeninowych, podobnie jak inne białka importowane do błony wewnętrznej w ten sam sposób, zawiera sekwencję kierującą wewnątrz dojrzałej postaci łańcucha polipeptydowego [28,30] (ryc. 2). Sekwencja ta rozpoznawana jest przez białko Tom70 (ryc. 2B), skąd translokaza z pośrednictwem kompleksu Tom20-Tom22 kierowana jest do kanału importowego kompleksu TOM. Po częściowej translokacji przez kanał translokaza trafia do przestrzeni międzybłonowej, przy czym nadal pozostaje związana z kompleksem TOM. Kolejny etap importu translokazy to oddziaływanie z heterooligomerem Tim9-Tim10 (ryc. 2C), co następnie umożliwia jej oddziaływanie z heterooligomerem Tim9-Tim10-Tim12 [6,16,40,69]. Oddziaływanie to powoduje z kolei odłączenie translokazy od kompleksu TOM, co prowadzi do zależnej od  $\Delta\Psi$  insercji w wewnętrzną błonę, w czym uczestniczy kompleks Tim22-Tim54 (patrz rozdz. 2) (ryc. 2D)[1,38]. Po wprowadzeniu w błonę translokaza przyjmuje ostateczną strukturę przestrzenną (ryc. 2D,E). Taką drogę importu opisano również dla innych przenośników metabolitów błony wewnętrznej, jak i składników kompleksów TIM (np. Tim17, Tim22, Tim23).

Druga droga importu białka do wewnętrznej błony to nietypowy proces eksportu białka wcześniej wprowadzonego do matriks (ryc.4A). Szlak ten służy m.in. wprowadzeniu do błony białka Oxa1, którego prekursor (pOxa1p) z klasyczną presekwencją kierowany jest do matriks przez kompleks Tim17-Tim23 (patrz podrozdz. 5.1) [25]. Po translokacji przez błony i odcięciu presekwencji, białko Oxa1 zwrótnie kieruje się do wewnętrznej błony, w której zakotwicza się w ten sposób, że jego aminowy koniec skierowany jest do przestrzeni międzybłonowej, a koniec karboksylowy do matriks. Eksport białka Oxa1 zależny jest od  $\Delta\Psi$  i nie wykorzystuje sygnału stop kotwiczącego eksportowane białko w błonie. Krytyczna dla eksportu w kierunku przestrzeni międzybłonowej jest natomiast obecność reszt aminokwasowych ob-





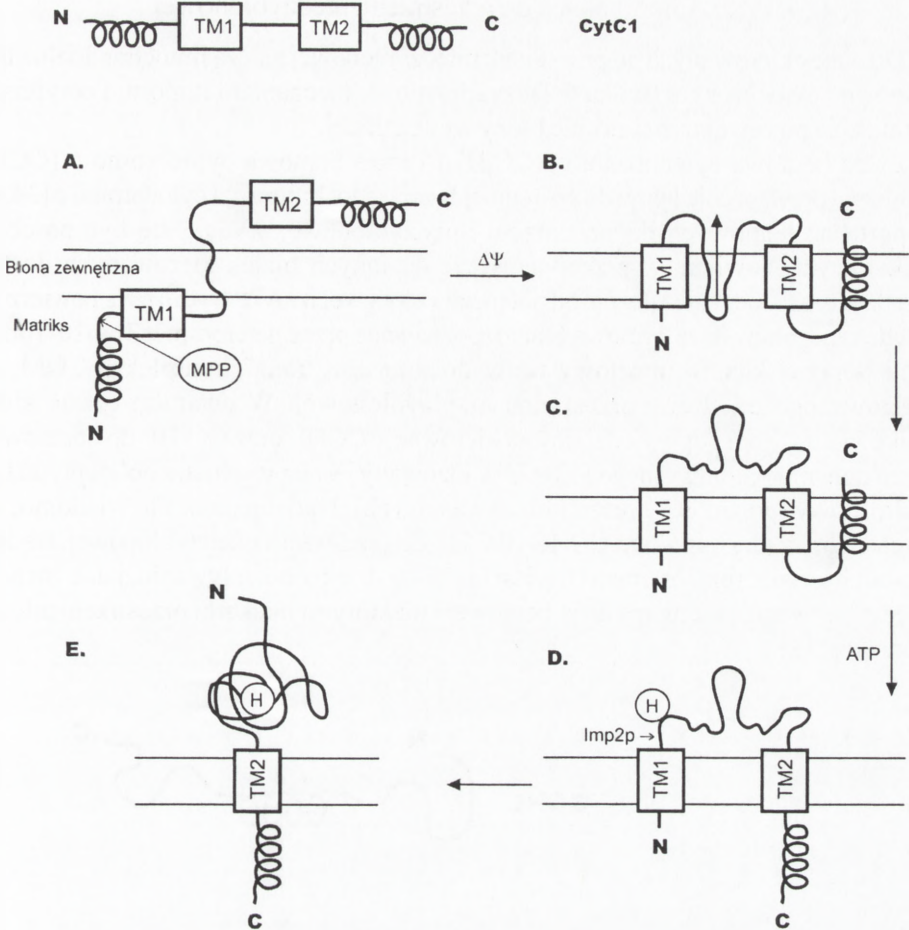
RYCINA 4. Schemat przedstawiający insercję białka Oxa1 w wewnętrzną błonę: import i eksport: A – ogólny schemat importu i eksportu z matryks i zależnej od  $\Delta\Psi$  insercji w błonę białka Oxa1 oraz białek kodowanych przez genom mitochondrialny, B – wprowadzenie Oxa1 do błony wewnętrznej – eksport z matryks (na podstawie [21])

darzonych ładunkiem ujemnym zlokalizowanych w obrębie aminowego końca białka Oxa1. Wówczas bogaty w aminokwasy obdarzone ładunkiem dodatnim koniec karboksylowy doprowadza do skutecznego eksportu końca aminowego [61] (ryc.4B). Oxa1, ulegając eksportowi z matriks, jest równocześnie centralnym składnikiem maszynarii odpowiedzialnej za insercję w błonę wewnętrzną białek kodowanych przez genom zarówno jądrowy, jak i mitochondrialny [22,23]. Mechanizm insercji białka Oxa1 w błonę wewnętrzną jest o tyle ciekawy, że łączy dwie drogi wprowadzania białka: import do matriks i występujący również u bakterii eksport (niezależna od białek sec, a zależna od pH insercja politopowych białek do błony bakteryjnej) [25]. Stąd twierdzi się, że import białek z rodziny przenośników, w którym uczestniczy kompleks Tim22-Tim54, jest ewolucyjnie młodszy.

Cytochrom  $c_1$  jest podjednostką kompleksu  $bc_1$  łańcucha oddechowego. Białko to powstaje w cytoplazmie w postaci prekursora zawierającego podwójną presekwencję umieszczoną na aminowym końcu oraz wewnętrzny sygnał sortujący znajdujący się na końcu karboksylowym (ryc. 5A)[20,21]. Pierwszą część presekwencji stanowi kła-syczny sygnał kierujący do matriks, proteolitycznie tam odcinany, w wyniku czego powstaje pośrednia forma cytochromu  $c_1$ . Drugą część presekwencji stanowi hydrofobowa sekwencja sortująca (TM1), która kieruje cytochrom  $c_1$  do błony wewnętrznej, podczas gdy aminowy koniec powstałej formy pośredniej pozostaje w matriks (ryc. 5B,C). Kolejny etap importu cytochromu  $c_1$  zostaje uruchomiony w wyniku kowalencyjnego związania grupy hemowej przez jego pośrednią formę. Jest to odcięcie hydrofobowej sekwencji sortującej (TM1) katalizowany przez proteazę Imp2 (ryc. 5D), co umożliwi powstanie dojrzałej formy cytochromu  $c_1$  (ryc.5E). Na wewnętrzny sygnał sortujący (TM2) składa się helisa transbłonowa i znajdujący się za nią, w kierunku końca karboksylowego, fragment łańcucha z traktem reszt aminokwasowych obdarzonych ładunkiem dodatnim. Ten wewnętrzny sygnał kieruje region cytochromu  $c_1$  zlokalizowany przy końcu karboksylowym z przestrzeni międzybłonowej do błony, po czym, w obecności  $\Delta\Psi$ , zakotwicza się w błonie wewnętrznej, prawdopodobnie tworząc strukturę szpilki do włosów (ryc.5C,D). Sygnał ten umożliwi następnie skierowanie karboksylowego końca cytochromu  $c_1$  z wewnętrznej błony do matriks. Białkami odgrywającymi ważną rolę w rozpoznaniu i translokacji przez wewnętrzną błonę tego typu sygnału są prawdopodobnie Tim17 i Tim23 [63]. Warto dodać, iż oba wymienione sygnały sortujące działają w sposób niezależny od siebie i są jednakowo istotne podczas importu i właściwej, zależnej od potencjału, insercji cytochromu  $c_1$  w błonę wewnętrzną.

Przebieg importu cytochromu  $c_1$  pozostaje nadal w sferze dyskusji. W ramach jednego z proponowanych modeli sugeruje się, że cytochrom  $c_1$  musi najpierw zostać wprowadzony do matriks, gdzie odsłonięta zostaje hydrofobowa sekwencja sortująca, co umożliwi zwrotne skierowanie do błony wewnętrznej. Mechanizm ten stanowi kontynuację układu wbudowywania białek do błony i przestrzeni peryplazmatycznej u bakterii. Stąd model ten nosi nazwę „konserwatywnego sortowania”. Alternatywne spojrzenie na ten problem daje hipoteza „zatrzymanego transteru” (z ang. *stop transfer*),





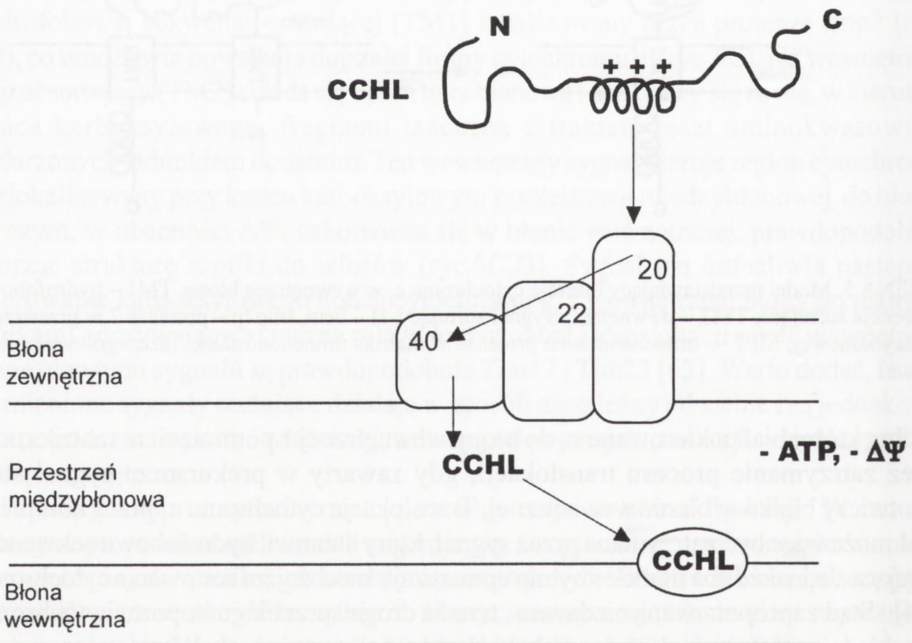
RYCINA 5. Model przedstawiający insercję cytochromu  $c_1$  w wewnętrzną błonę: TM1 – hydrofobowa sekwencja sortująca, TM2 – wewnętrzny sygnał sortujący, H – hem, Imp2p – proteaza 2 w przestrzeni międzybłonowej, MPP – mitochondrialna proteaza w matriks mitochondrialnej (szczegółowy opis w tekście)

według której białka kierowane są do błony wewnętrznej z pominięciem matriks, a to przez zatrzymanie procesu translokacji, gdy zawarty w prekursorze sygnał stop zakotwiczy białko w błonie wewnętrznej. Translokacja cytochromu  $c_1$  przez kompleks TIM może więc być zatrzymana przez sygnał, który stanowi hydrofobowa sekwencja sortująca. Jednakże oba modele zbytnio upraszczają mechanizm sortowania cytochromu  $c_1$  [4]. Stąd zaproponowana niedawno „trzecia droga” przebiegu importu cytochromu  $c_1$ , zakładająca istnienie dwóch odrębnych sekwencji sortujących. Wewnętrzny sygnał sortujący umieszczony na karboksylowym końcu cytochromu  $c_1$  nie wymaga bowiem importu do matriks podobnie jak sygnał sortujący z końca aminowego, który nie zatrzymuje się w błonie podczas importu, a prawdopodobnie przechodzi do matriks w nieznanym jeszcze sposób [4]. <http://rcin.org.pl>

### 5.3. Import białek do przestrzeni międzybłonowej

Do białek kierowanych do przestrzeni międzybłonowej należą mitochondrialne liazy hemowe i cytochrom c. Białka te łączy nietypowy mechanizm importu i peryferyjna lokalizacja po zewnętrznej stronie błony wewnętrznej.

Liaza hemowa cytochromu  $c_1$  (CC<sub>1</sub>HL) i liaza hemowa cytochromu c (CCHL) katalizują przyłączenie hemu do pośredniej formy cytochromu  $c_1$  i cytochromu c [34,40]. Import liaz hemowych do przestrzeni międzybłonowej wydaje się być procesem unikatowym, bowiem, w przeciwieństwie do innych białek kierowanych do tego przedziału, zachodzi niezależnie od potencjału błonowego i ATP (ryc. 6). Na powierzchni zewnętrznej błony liaza hemowa jest rozpoznawana przez heterodimer Tom20-Tom22, skąd poprzez kanał importowy trafia do miejsca „trans” kompleksu TOM zlokalizowanego od strony przestrzeni międzybłonowej. W ostatnim czasie zidentyfikowano sygnał odpowiedzialny za kierowanie CCHL oraz CC<sub>1</sub>HL do docelowego przedziału mitochondrialnego [13]. Zlokalizowany jest on wewnątrz polipeptydu i jest hydrofilowy (ponad 30% reszt aminokwasowych). Nadal jednak nie wiadomo, jaki mechanizm rządzi importem CCHL i CC<sub>1</sub>HL do przestrzeni międzybłonowej. Badania ostatnich lat sugerują, że import ten jest możliwy dzięki oddziaływaniu, jakie zachodzi między sekwencją kierującą liazy hemowej i niektórymi białkami przestrzeni międzybłonowej [13].



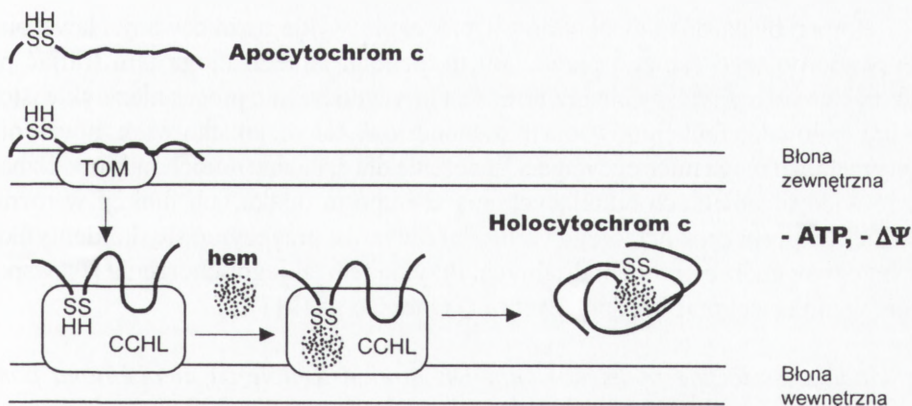
RYCINA 6. Model importu CCHL do przestrzeni międzybłonowej (szczegółowy opis w tekście)



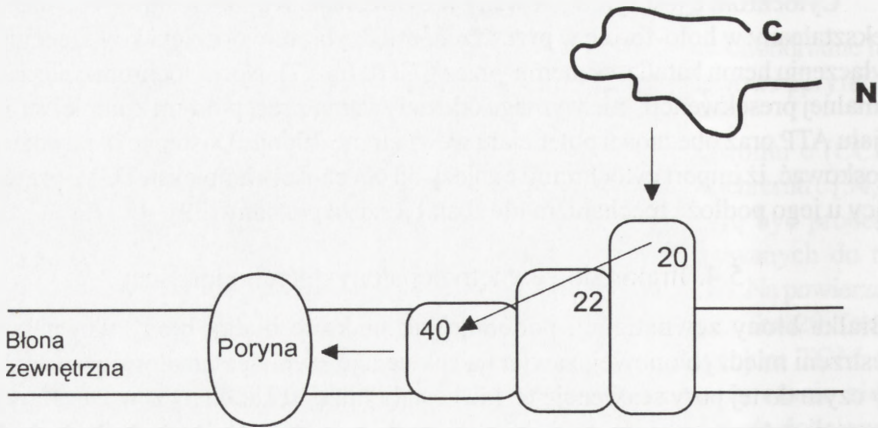
Cytochrom c jest syntetyzowany w cytozolu jako apocytochrom c, a następnie przekształcany w holo-formę w przestrzeni międzybłonowej dzięki kowalencyjnemu przyłączeniu hemu katalizowanemu przez CCHL (ryc.7). Apocytochrom c nie zawiera odcinalnej presekwencji, nie wymaga oddziaływania z receptorami kompleksu TOM, udziału ATP oraz obecności potencjału wewnętrznej błony. Dostępne dane pozwalają wnioskować, iż import cytochromu c zależy od obecności kompleksu TOM, przy czym leżący u jego podłoża mechanizm nie został jeszcze poznany [39].

#### 5.4. Import do zewnętrznej błony mitochondrialnej

Białka błony zewnętrznej, podobnie jak niektóre białka błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej, zawierają sekwencje kierujące nieulegające usunięciu, przy czym do tej pory sekwencje te nie zostały bliżej scharakteryzowane. Najwięcej informacji dotyczących importu do błony zewnętrznej uzyskano w przypadku składników kompleksu TOM i poriny mitochondrialnej, nazywanej również kanałem VDAC (z ang. *voltage dependent anion selective channel*) [42,64]. W przypadku składników kompleksu TOM (z wyjątkiem białka Tom40) za sygnały kierujące uznaje się sekwencje aminokwasowe tworzące helisy transbłonowe kotwiczące te białka w błonie lub sekwencje je flankujące [27]. W przypadku białka Tom40 postuluje się, iż sygnał kierujący znajduje się w środkowej części polipeptydu, przy czym istotną rolę odgrywa także sekwencja znajdująca się na końcu aminowym, która umożliwia powstanie funkcjonalnego oligomeru Tom40, odgrywającego kluczową rolę w działaniu kanału importowego [58]. Z kolei sekwencja kierująca białko VDAC, uznawane za białko markerowe dla błony zewnętrznej, zlokalizowana jest na jego obu końcach lub tylko na końcu karboksylowym [35].



RYCINA 7. Model importu cytochromu c do przestrzeni międzybłonowej (szczegółowy opis w tekście)



RYCINA 8. Schemat importu poriny mitochondrialnej do błony zewnętrznej z udziałem białek Tom20, Tom22 i Tom40

Skuteczny import białek do błony zewnętrznej, w tym białek Tom i VDAC, wymaga obecności ATP, białka Hsp70 oraz funkcjonalnego kompleksu TOM ( ryc. 8). Po rozpoznaniu przez receptor Tom20, białka te przy udziale Tom22 kierowane są do kanału importowego, skąd prawdopodobnie uwalniane są bezpośrednio do błony [3].

## 6. PODSUMOWANIE

Import białka do mitochondriów to proces niezwykle zróżnicowany. Nawet białka kierowane do tego samego przedziału mitochondrialnego mogą tam trafiać przy wykorzystaniu różnych mechanizmów. Jest to równocześnie proces niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Zatem, jakiegokolwiek zaburzenia w jego przebiegu mogą mieć decydujące znaczenie dla działania mitochondriów. Oznacza to, że wiedza o białkach budujących aparat importu białka, ich funkcji w różnych szlakach importu oraz przebiegu tych szlaków może przyczynić się do identyfikacji nowego typu chorób mitochondrialnych. Przykładem takiego schorzenia jest wspomniany w niniejszej pracy zespół Mohra -Tranebjaerga (MTS).

*Składam serdeczne podziękowania Dr Hannie Kmicie za nieocenioną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy.*



## LITERATURA

- [1] ADAM A, ENDRES M, SIRRENBERG C, NEUPERT W. Tim9, a new component of the Tim22-Tim54 translocase in the mitochondria. *EMBO J* 1999; **18**: 313–319.
- [2] AHTING U, THIEFFRY M, ENGELHARDT H, HEGERL R, NEUPERT W, NUSSBERGER S. Tom40, the Pore-forming Component of the Protein-conducting TOM Channel in the Outer Membrane of Mitochondria. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1151–1160.
- [3] AHTING U, THUN C, HERGEL R, NEUPERT W. TOM Core Complex The General Protein Import Pore of the Outer Membrane of Mitochondria. *J Cell Biol* 1999; **147**: 959–968.
- [4] ARNOLD I, FÖLSCH H, NEUPERT W, STUART RA. Two distinct and Independent Mitochondrial Targeting Signals Function in the Sorting of an Inner Membrane Protein, Cytochrom  $c_1$ . *J Biol Chem* 1999; **273**: 1469–1476.
- [5] ARNOLD I, PFEIFFER K, NEUPERT W, STUART RA, SCHAGGER H. Yeast mitochondrial F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP syntase exists as a dimer in identification of three dimer specific subunits. *FEBS Lett* 1998; **411**: 195–200.
- [6] BAUER MF, NEUPERT W. Import of proteins into mitochondria: A novel pathomechanism for progressive neurodegeneration. *J Inher METAB DIS* 2001; **24**: 166–180.
- [7] BAUER M, ROTHBAUER U, MUHLENBEIN N, NEUPERT W. The Mitochondrial Tim 22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eucariotic kingdom. *FEBS Lett* 1999; **464**: 41–47.
- [8] BAUER MF, SIRRENBERG C, NEUPERT W, BRUNNER M. Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* 1996; **87**: 33–41.
- [9] BUTISTA J, CORPAS R. Brain Mitochondria Complex I Inactivation by Oxidative Modification. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 890–894.
- [10] CHEN K, CHEN X, SCHNELL DJ. Initial Binding of Preproteins Involving the Toc 59 Receptor Can Be Bypassed during Protein Import into Chloroplasts. *P Phys* 2000; **122**: 813–822.
- [11] DEMBOWSKI M, KÜNKELE KP, NARGANG FE, NEUPERT W, RAPAPORT D. Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM Core Complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 2001; **276**: 17679–17685.
- [12] DEKKER PJT, RYAN MT, BRIX J, MÜLLER A, HÖNLINGER A, PFANNER N. Preproteins translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 6515–6524.
- [13] DIEKIERT K, KISPAL G, GUIARD B, LILL R. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11752–11757.
- [14] DIETMEIER K, HÖNLINGER A, BOMER U, DEKKER PJT, ECKERSKORN C. Tom5 functionally links mitochondrial preproteins receptors to the general import pore. *Nature* 1997; **388**: 121–122.
- [15] DONZEAU M, KALDI K, ADAM A, PASCHEN S, WANNER G, GUIARD B, BAKER MF, NEUPERT W, BRUNNER M. Tim 23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* 2000; **101**: 401–412.
- [16] ENDRES M, NEUPERT W, BRUNNER W. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the Tim22-Tim54 complex. *EMBO J* 1999; **18**: 3214–3221.
- [17] ENDRES M, NEUPERT W, BRUNNER W. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the Tim22-Tim54 complex. *EMBO J* 1999; **94**: 211–218.
- [18] FÜNFSCHILLING U, ROSPERT S. Nascent polipeptide – associated complex stimulates import into yeast mitochondria. *Mol Biol* 1999; **10**: 3289–3299.
- [19] GAUME B, KLAUS C, UNGERMANN C, GUILARD B, NEUPERT W, BUNNER M. Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J* 1999; **17**: 6497–6507.
- [20] GLICK BS, BRANDT A, CUNNINGHAM K, MÜLLER S, SCHATZ G. Cytochrom  $C_1$  and cytochrom  $B_c$  are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by stop-transfer mechanism. *Cell* 1992; **69**: 809–822.
- [21] HAMEL P, LEMAIRE C, BOUNEFOY N, BRIVET-CHEVILLOTTE P, DUJARDIN G. Mutations in the membrane anchor of yeast cytochrome  $c$  compensate for the absence of Oxa1p and generate carbonate-extractable forms of cyt  $c_1$ . *Genetics* 1997; **150**: 601–611.
- [22] HE S, FOX T. Membrane translocation of mitochondrially coded Cox 2p: distinct requirements for export of N and C conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 1449–1460.
- [23] HELL K, HERMANN JM, PRETJE, NEUPERT W, STUART R. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2250–2255.
- [24] HILL K, MODEL, RYAN MT, DIETMEIER K, MARTIN F, WAGNER R, PFANNER N. Tom40 forms the hydrophobic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 1998; **396**: 516–521.

- [25] HERRMAN JM, NEUPERT W, STUART AR. Insertion into inner membrane of a poliotopic protein, the nuclear-encoded Oxalp. *EMBO J* 1997; **16**: 2217-2226.
- [26] JÄNSCH L, KRUF T V, SCHMITZ K, BRAUN HP. Unique Composition of the Preprotein Translocase of the Outer Membrane from Plants. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17251-17257.
- [27] KIDA J, KANAJI S, IWAHASHI YA, SAKAGUCKI M. Characterization of signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 2000; **151**: 277-288.
- [28] KERSCHER O, HOLDEER J, SRINIVASAN M, LEUNG RS, JENSEN RE. The Tim 54p-Tim 22p complex mediates insertion of proteins into mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1663-1675.
- [29] KERCHER O, NARESH B, SEPURI J. Tim18 is a new Component of the Tim54-Tim22, translocation in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol of the Cell* 2000; **11**: 109-116.
- [30] KOEHLER C. Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett* 2000; **476**: 27-31.
- [31] KOEHLER CM, JAROSCH E, TOKADLIDIS K, SMIDT K, SCHWEYEN RJ, SCHATZ G. Import of the mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* 1998; **279**: 369-373.
- [32] KOEHLER CM, LEUENBERGER D, MERCHANT S, RENOLD A, JUNNE T, SCHATZ G. HUMAN deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2141-2146.
- [33] KOEHLER CM, MERCHANT S, OPPLINGER. The Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J* 1998; **17**: 6477-6486.
- [34] KRANZ R, LILL R, GOLDMAN B, BONNARD G, MERCHANT S. Molecular mechanisms of cyt c biogenesis: three distinct systems. *Mol Microbiol* 1998; **29**: 383-396.
- [35] KRIMMER I, RAPAROT D, RYAN MT, MESINGER C, KASSENBRÖCK CK, BLACKLYN-DYSONE, FORTE M, DOUGLAS MG. Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *Cell Biol* 2000; **153**: 289-300.
- [36] KÜNKELE KP, HEINS KP, DEMBOWSKI M, NARGANG FE, BENZ R, THIEFFRY M, WALZ Y, LILL R, NUSSBERGER S, NEUPERT W. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 1998; **93**: 1009-1019.
- [37] KÜNKELE KP, JUIN C, POMPA, NARGANG FE, HENRY JP, NEUPERT W, LILL R, THIEFFRY M. The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 31032-31039.
- [38] LEUENBERGER P, BALLY NA, SCHATZ G. Different import pathway through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *EMBO J* 1999; **17**: 4816-4822.
- [39] LILL R. 2000. Personal communication.
- [40] LITHGOW T. Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett* 2000; **476**: 22-26.
- [41] LOHRENT TA, JENSEN RE, KINALLY KW. Tim23, a protein component of the mitochondrial inner membrane is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. *J Cell Biol* 1997; **137**: 377-386.
- [42] MANELLA C. On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1997; **29**: 525-531.
- [43] MATOUSCHEK A., AZEM A., RATLIFF K., SCHMID B.S., SCHATZ G. Active unfolding of precursor proteins during mitochondrial protein import. *EMBO J* 1997; **16**: 6727-6736.
- [44] MAYER A, LILL R, NEUPERT W. Translocation and insertion of precursor proteins into outer membranes of mitochondria. *J Cell Biol* 1993; **121**: 1233-1243.
- [45] MERLIN A, VOSS W, MAARSEA C, MEIJER M, PFANNER N, RASSOW J. The J-related segment of Tim44 is essential for cell viability: A mutant Tim44 remains in the mitochondrial import site, but inefficiently recruits mtHsp 70 and impairs protein translocation. *J Cell Biol* 1999; **145**: 961-972.
- [46] MICHEJDA J. Podstawy biologii komórki roślinnej. 2000; **8**: 335-345.
- [47] MICHEJDA J. Import białek do mitochondriów. *KOSMOS: Problemy nauk biologicznych* 1997; **46**, 1: 71-80.
- [48] MICHEJDA J, HRYNIEWIECKA L. Mitochondria. (w) Podstawy cytofizjologii, PWN. 1995; 193-198.
- [49] MORI M, TERADA K. Mitochondrial protein import in animals. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1403**: 12-27.
- [50] MORO F, SIRRENBERG C, SCHNEIDER H, NEUPERT W, BRUNNER M. The Tim17/Tim23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J* 1999; **18**: 3367-3675.
- [51] NAŁĘCZ K. Transport białek przez błony biologiczne. *Post Biochem* 1993; **39**, 4: 242-250.
- [52] PALMISANO A, ZARA V, HÖNLINGER A, VOZZA JT, PFANNER N, PALMIERI F. Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 1998; **333**: 151-158.



- [53] PASCHEN SA, ROTHENBAUER U, KALDIK et al. The role of the Tim8-Tim13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J* 2000; **19**: 6332–6400.
- [54] PERRYMAN R, MOONAY B, HARMEY A. Identification of 42 kD Plant Mitochondrial Outer Membrane Protein, Mom42, Involved in the Import of Precursor Proteins into Plant Mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1997; **316**: 659–664.
- [55] PFANNER N, CRAIG E, HÖNLINGER A. Mitochondrial protein translocase. *Cell* 1997; **13**: 25–51.
- [56] PFANNER N, MEIJER M. Mitochondrial biogenesis – The Tom and Tim machine. *Curr Biol* 1997; **7**: R100–103.
- [57] RAPPAPORT D, MAYER D, NEUPERT W, LILL R. Cis and trans sites of the TOM complex of mitochondria in unfolding and initial translocation of preproteins. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8806–8813.
- [58] RAPPAPORT D, NEUPERT W. Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol* 1999; **146**: 321–333.
- [59] RAPPAPORT D, NEUPERT W, LILL R. Mitochondrial protein import, Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequences. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18725–18731.
- [60] RASSOW J, DEKKER PJT, S VAN DER WILPE, MEIJER M, SOLL J. The translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J Mol Biol* 1999; **286**: 105–120.
- [61] ROJO EE, GUIARD B, NEUPERT W, STUART RA. N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. Adherence to the prokaryotic „positive” inside rule of membrane protein topology. *J Biol Chem* 1999; **28**: 19617–19622.
- [62] RYAN MT, MÜLLER H, PFANNER N. Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 1999; **274**: 20619–20627.
- [63] SAEKI K, TSUNEOKA M, IWAMOTO R, HAUSUWA H, SHIDA S, TAKAHASHI T, SAKAGUCKI M, ENDO T, MIURA Y, MEKADA E, MIHARA K, SUZUKI H. Identification of Mammalian Tom22 as a subunit of the Preprotein Translocase of the Mitochondrial Outer Membrane. *J Biol Cell* 2000; **147**: 31996–32002.
- [64] SCHLEIFF E, SILVIUS R, GORDON C, SHORE G. Direct Membrane Insertion of Voltage dependent Anion-Selective Channel Protein Catalysed by Mitochondrial Tom20. *J Cell Biol* 1999; **145**: 973–978.
- [65] SCHLOSSMAN J, LILL R, NEUPERT W. Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17890–17895.
- [66] SCHNEIDER HC, BERTHOLD J, BAUER FM, DIETMEIER K, GUIARD B, BRUNNER M, NEUPERT W. Mitochondrial Hsp 70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 1994; **371**: 768–764.
- [67] SIRRENBERG C, ENDERM, FÖLSCH M, NEUPERT W. Carrier protein import mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs 11, and Tim12/Mrs5. *Nature* 1998; **391**: 912–915.
- [68] SJÖLING S, GLASSER E. Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 136–139.
- [69] TOKADLIDIS K, SCHATZ G. Biogenesis of Mitochondrial Inner Membrane Proteins. *J Biol Chem* 1999; **274**: 35285–35288.
- [70] VIOSINE C, CRAIG EA, ZUFALL N, AHSEN O, PFANNER N, VOSS W. The protein import motor of mitochondria : Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* 1997; **97**: 565–574.
- [71] WHELAN J, GLASER E. Protein import into plant mitochondria. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 771–189.
- [72] YANO M, KANAZAWA M, TAKEYA M, HOOGENRAAD N, TERADA K, MORI M. Functional Analysis of Human Mitochondrial Receptor Tom20 for Protein into Mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26844–26851.
- [73] ZHANG X-P, ELOFSSON A, ANDREU D, GLASER E. Interaction of mitochondrial presequences with DnaK and Mitochondrial hsp70. *J Mol Biol* 1999; **288**: 177–190.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 07.01. 2002 r.

Przyjęto: 15.02.2002 r.

Adres autora: Poznań 60-701, ul. Fredry 10.

e-mail: woytek@main.amu.edu.pl

The first part of the paper deals with the general principles of the theory of the evolution of the human mind. It is shown that the human mind is not a static entity, but a dynamic one, which is constantly changing and developing. The author discusses the various factors which influence the development of the human mind, such as the environment, the social conditions, and the individual's own experiences. He also discusses the different stages of the human mind, from the primitive to the modern, and the different types of human beings, from the savage to the civilized. The author concludes that the human mind is a product of its environment, and that it is constantly evolving and developing. This is a very important point, and it is one which is often overlooked in the study of the human mind. The author's argument is based on a number of observations and facts, and it is a very convincing one. It is a pity that the paper is so long and so difficult to read, but it is a very valuable contribution to the study of the human mind.



## MOLEKULARNE ASPEKTY KLONOWANIA SOMATYCZNEGO ZWIERZĄT

### MOLECULAR ASPECTS OF SOMATIC CLONING IN ANIMALS

Magdalena BRYŁA

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,  
w Balicach koło Krakowa

*Streszczenie:* Postęp w dziedzinie klonowania somatycznego ssaków był możliwy dzięki badaniom nad interakcjami jądrowo-cytoplazmatycznymi między enukleowanym oocytem-biorcą a dawcą egzogenne-go jądra komórkowego. Ważnym czynnikiem, który bezpośrednio wpływa na ten proces, jest poziom aktywności MPF w cytoplazmie oocytu. Czynniki ten oddziałuje na cytoszkielet mikrotubularny i otoczkę jądrową, warunkując określoną formę przestrzenną chromatyny umożliwiającą skoordynowaną replikację DNA w zrekonstruowanym oocycie. Pozwala to na uruchomienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za przeprogramowanie genomu komórki somatycznej w cytoplazmie dojrzalego oocytu-biorcy.

*Słowa kluczowe:* oocyt, MPF, cykl komórkowy, przeprogramowanie

*Summary:* Advances in the somatic cloning of animals were possible thanks to research on the nuclear-cytoplasmic interactions between enucleated recipient-oocyte and donor exogenous cell nucleus. One of the factors that has a direct influence on these interactions is the level of MPF activity in the oocyte cytoplasm. High level of MPF activity affects the microtubular cytoskeleton, nuclear envelope as well as the spatial form of chromatin enabling coordinated replication of DNA in the reconstructed oocyte. This leads to the activation of molecular mechanisms responsible for the reprogramming of the genome of the donor somatic cell in the recipient-oocyte's cytoplasm.

*Key words:* oocyte, MPF, cell cycle, reprogramming

Uwieńczone sukcesem eksperymenty Iana Wilmuta i Keitha Campbella z Roslin Institute w Szkocji otworzyły nowy rozdział w dziedzinie klonowania ssaków [41]. Narodziny owcy Dolly oraz kolejne doświadczenia, w których uzyskano potomstwo także u innych gatunków ssaków [2,19,28,39,40] potwierdziły możliwość klonowania dorosłych ssaków.

Technika klonowania somatycznego umożliwia powielanie osobników wybitnych pod względem określonych cech, jednak jej atrakcyjność wiąże się przede wszystkim z możliwością uzyskiwania zwierząt transgenicznych [7]. Wydajność metody jest niska i nie przekracza obecnie kilku procent [2, 19, 28].

Zwiększenie efektywności klonowania somatycznego jest więc warunkiem koniecznym, aby metoda znalazła praktyczne zastosowanie. Kluczem do osiągnięcia tego celu będzie rozpoznanie czynników, które warunkują prawidłowe przemodelowanie i przeprogramowanie egzogenego jądra komórkowego w środowisku cytoplazmatycznym oocyty – biorcy.

W klonowaniu somatycznym biorcą egzogenych jąder komórkowych są dojrzałe *in vivo* lub *in vitro* oocyty, zatrzymane w metafazie drugiego podziału mejotycznego, a więc w stadium, w którym nie występuje otoczka jądrowa, a skondensowana chromatyna ma postać chromosomów ustawionych w płaszczyźnie równika wrzeciona podziałowego.

W cytoplazmie dojrzałego oocyty enzymem zaangażowanym w utrzymanie bloku w metafazie II jest MAP kinaza (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*). Po rozpadzie otoczki jądrowej aktywność tego enzymu rośnie i osiąga maksimum w metafazie pierwszego podziału dojrzewania. Za zapoczątkowanie aktywacji MAP kinazy odpowiedzialna jest kinaza białkowa Mos. Aktywuje ona kinazę MAP kinazy, MEK-1, a ta aktywuje MAP kinazę. MAP kinaza nie jest inaktywowana podczas przejścia metafaza I/metafaza II, w tym okresie jest ona odpowiedzialna za utrzymanie chromatyny oocyty w stanie skondensowanym, a także uniemożliwia odtworzenie interfazowej sieci mikrotubul [37]. Aktywność MAP kinazy utrzymuje się na wysokim poziomie także w oocytach zablokowanych w metafazie II, a spada po aktywacji oocyty. Aktywacja MAP kinazy jest konieczna do powstania aktywności cytostatycznej odpowiedzialnej za zablokowanie dojrzewających oocytów w metafazie II [14].

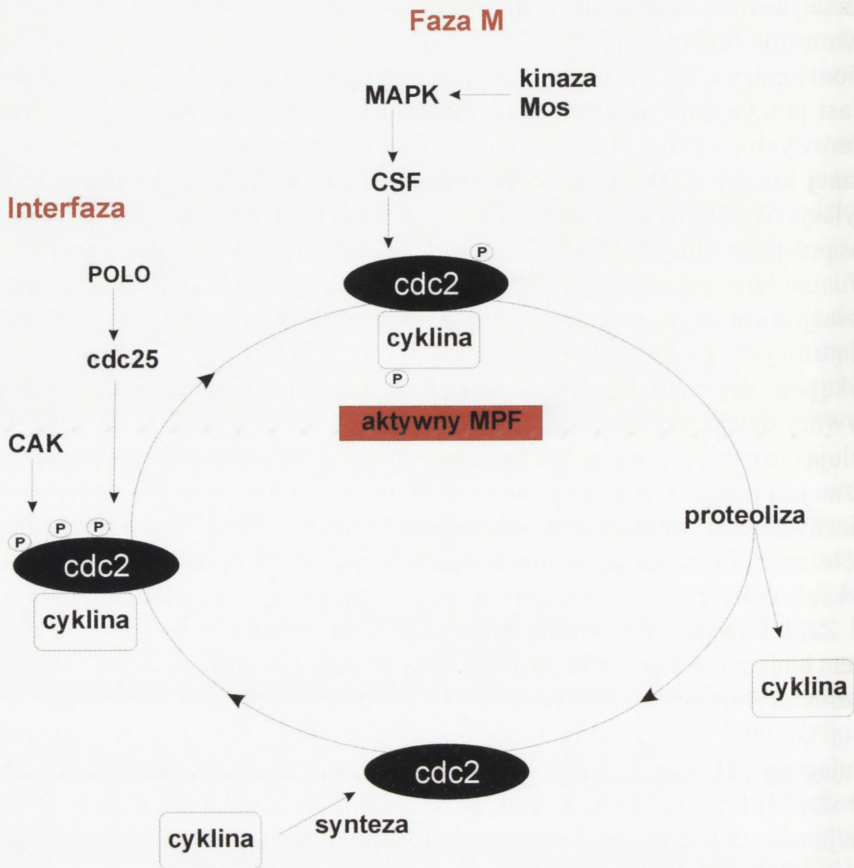
Charakterystyka środowiska cytoplazmatycznego oocyty biorcy wskazuje na rolę czynników w niej występujących. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że cytoplazma wyjądrzonego oocyty zachowuje właściwości umożliwiające przeprogramowanie zróżnicowanego jądra komórki somatycznej w jądro zygoty, co jest warunkiem koniecznym dla rozwoju zrekonstruowanych zarodków. Istotną rolę odgrywa tutaj czynnik MPF (ang. *M-phase Promoting Factor* lub *Maturation Promoting Factor*) [3, 4], który bierze udział w zapoczątkowaniu zarówno podziałów mejotycznych, jak i mitotycznych. Zidentyfikowano go po raz pierwszy w cytoplazmie dojrzewających oocytów żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) [22]. MPF jest dimerem złożonym z dwu podjednostek: katalitycznej – (kinazy białkowej o masie 34 kDa, homologicznej z białkiem cdc2 wyizolowanym z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) oraz regulacyjnej – (cykliny B). Kinaza cdc 2 należy do rodziny kinaz białkowych CDK (ang. *Cyclin Dependent Kinase*), biorących udział w regulacji takich procesów w cyklu komórkowym, jak synteza DNA czy mitoza. Regulacja aktywności enzymów z grupy CDK odbywa się przez:

- przejściowe połączenie ze specyficznymi podjednostkami regulatorowymi (cyklinami),



- oddziaływanie z inhibitorami białkowymi,
- odwracalną fosforylację.

Poziom kinazy CDK nie ulega istotnym wahaniom w czasie cyklu komórkowego, natomiast precyzyjnie określony jest moment syntezy i degradacji podjednostek regulatorowych – cyklin. Dzięki temu możliwe jest przyporządkowanie aktywności określonej kinazy CDK do specyficznego okresu w cyklu komórkowym [27]. Fosforylacja określonych białek katalizowana przez MPF odgrywa podstawową rolę podczas przejścia z fazy G2 do M. Fosforylacja histonu H1 oraz białek z grupy HMG (ang. *Human Menopausal Gonadotropin*), katalizowana przez kinazę cdc2, towarzyszy kondensacji chromatyny w jądrze [4, 30]. Kinaza cdc2 bierze też udział w fosforylacji lamin jądrowych, co prowadzi do degradacji otoczki jądrowej [29], wpływając na dynamikę polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul. MPF utrzymywany jest w formie nieaktywnej dzięki aktywności kinaz białkowych Wee1 [12] i Myt1 [26], które fosforylują tyrozynę w pozycji 15 i treoninę w pozycji 14. Aby zaszła aktywacja MPF, konieczne jest połączenie kinazy cdc2 z cyklina B oraz fosforylacja i defosforylacja specyficznych reszt aminokwasowych białka cdc2 (ryc.1). Dodatkowo niezbędne jest usunięcie specyficznych inhibitorów białkowych, które odwracalnie łączą się z kompleksem cdk2-cyklina E zaangażowanego w aktywację kompleksu cdc2-cyklina B [43]. Zablockowanie aktywności kinazy cdk2 uniemożliwia rozpoczęcie mitozy. Enzymem biorącym bezpośredni udział w aktywacji cdc2 jest fosfataza białkowa cdc25, która defosforyluje tyrozynę w pozycji 15 i treoninę w pozycji 14. Wiadomo, że po aktywacji kompleksu cdc2-cyklina B kompleks ten może fosforylować fosfatazę cdc25 powodując jej aktywację. Takie sprzężenie zwrotne tłumaczy gwałtowny wzrost aktywności MPF po rozpoczęciu mitozy. Obok MPF enzymem zaangażowanym w aktywację cdc-25 jest kinaza zaliczana do rodziny kinaz określonych jako Polo lub PLK (ang. *POLO-Like-Kinase*). Badania na oocytach *Xenopus laevis* wykazały, że kinaza Polo odpowiedzialna jest za aktywację fosfatazy cdc25, a tym samym za aktywację MPF, bierze także udział w prawidłowym funkcjonowaniu wrzeciona podziałowego. Do aktywności MPF niezbędna jest również aktywność kinazy białkowej CAK (ang. *CDK Activating Kinase*) na skutek fosforylacji treoniny w pozycji 161. *In vitro* funkcję CAK pełni kompleks cdk7 – cyklina H [13, 31]. Inaktywacja MPF podczas przejścia metafaza/anafaza związana jest z proteolityczną degradacją cykliny B, zachodzącą równocześnie z ruchem anafazowym chromosomów. Aby doszło do degradacji cykliny B, musi nastąpić aktywacja wielobiałkowego kompleksu określonego jako „cyklosom” lub kompleks inicjujący anafazę APC (ang. *Anaphase Promoting Complex*). Składniki APC to białka i enzymy odpowiedzialne za połączenie białka mającego ulec degradacji z ubikwityną oraz proteosom, który jest odpowiedzialny za degradację ubikwitynowego białka [42]. Prawdopodobnie rolę w aktywacji kompleksu odgrywa sygnał z prawidłowo uformowanego wrzeciona mitotycznego. Zapoczątkowanie ruchu anafazowego wymaga degradacji białek zaangażowanych w połączenie chromatyd siostrzanych (Cut2, Pds1). APC odpowiedzialny jest również za degradację cykliny B. Inaktywacja kompleksu APC zachodzi dopiero w fazie G1 i jest katalizowana przez kinazy CDK charakterystyczne dla tej fazy. Do rozpadu otoczki



RYCINA 1. Mechanizm aktywacji MPF, schemat uwzględnia czynniki zaangażowane w pojawienie się aktywności cytotatycznej w metafazie II podziału mejotycznego: p – grupa fosforanowa; dalsze objaśnienia w tekście

jądrowej dochodzi w oocytach, które uzyskały kompetencję do kontynuowania dojrzewania mejotycznego i są w stanie zareagować na zewnętrzny sygnał inicjujący ten proces. Warunkiem niezbędnym jest zgromadzenie w cytoplazmie oocytów odpowiedniej ilości podjednostki katalitycznej MPF – białka cdc2 [8]. Defosforylacja tego białka na tyrozynie 15 i treoninie 14 prowadzi do rozpadu otoczki jądrowej i formowania wrzeciona podziałowego [9]. Następnie aktywność MPF narasta stopniowo i osiąga maksimum w metafazie pierwszego podziału mejotycznego. Podczas wyrzucenia pierwszego ciała kierunkowego aktywność MPF przejściowo spada, co jest wynikiem gwałtownej degradacji cykliny B. Po wyrzuceniu pierwszego ciała kierunkowego MPF jest ponownie aktywowany dzięki syntezie cykliny B i tworzeniu kompleksu z białkiem cdc2. Równocześnie formowane jest wrzeciono metafazy II, a po osiągnięciu tego stadium aktywność MPF utrzymuje się na wysokim poziomie aż do zapłodnienia lub aktywacji oocytu.



Czynnikiem odpowiedzialnym za stabilizację aktywności MPF w trakcie metafazy II oocytu odkrytym w oocytach płazów [22] jest czynnik cytotatyczny CSF (ang. *Cytostatic Factor*). Do wytworzenia aktywności cytotatycznej CSF niezbędna jest kinaza Mos aktywująca MAP kinazę [14]. Pojawienie się aktywności MAP kinazy w dojrzewających oocytach skorelowane jest z akumulacją białka Mos [38]. Po aktywacji oocytu następuje stopniowy spadek aktywności czynnika cytotatycznego. Podczas dojrzewania oocytu kinaza Mos biorąca udział w aktywacji kinazy MAP odpowiedzialna jest za utrzymanie oocytów w metafazie II. Prawdopodobnie za wytworzenie aktywnego CSF odpowiedzialny jest czynnik (lub czynniki), które aby ulec aktywacji, muszą być najpierw ufosforylowane przez kinazę MAP, a następnie przez MPF [1].

Dotychczasowe badania nad rolą CSF wskazują, że czynnik ten przeciwdziała proteolitycznej degradacji cykliny B, zapobiegając w ten sposób inaktywacji MPF. W stadium metafazy II degradacji cykliny B towarzyszy jej ciągła synteza, co umożliwia utrzymanie aktywności MPF na stałym poziomie. Po aktywacji oocytu dochodzi do gwałtownej degradacji cykliny B przewyższającej poziom syntezy tego białka, co prowadzi do inaktywacji MPF. Rolą CSF byłoby zatem spowolnienie/osłabienie degradacji cykliny B umożliwiające zachowanie równowagi między jej syntezą a degradacją. Po aktywacji poziom CSF zanika stopniowo, a obecność aktywnej kinazy MAP i białka Mos jest prawdopodobnie związana z ciągłą obecnością CSF [18].

W dojrzałym oocycie przestają funkcjonować mechanizmy mejotyczne, a ich miejsce zajmują mechanizmy typowe dla kontroli cyklu mitotycznego. Następuje inaktywacja CSF, a utrzymujący się wysoki poziom MPF wpływa na organizację cytoszkieletu. Wiadomo, że czynnik ten oddziałuje na cytoszkielet mikrotubularny i otoczkę jądrową podtrzymując ich metafazowy charakter [37, 38]. Wpływa na fosforylację białek towarzyszących mikrotubulom oraz laminy B, białka wchodzącego w skład osłonki jądrowej [29].

Jednym z istotnych czynników wpływających na efektywność klonowania jest właściwy dobór faz cyklu komórkowego dawcy jądra komórkowego i komórki-biorcy. Dojrzałe oocyty wykazują bardzo wysoki poziom MPF warunkujący rozpoczęcie podziału mitotycznego w komórce i determinują prawidłowy rozwój rekonstruowanych zarodków. Po wprowadzeniu jądra interfazowego do wyjądrzonego oocytu dochodzi do: rozpadu otoczki jądrowej NEBD (ang. *Nuclear Envelope Breakdown*) i przedwczesnej kondensacji chromosomów PCC (ang. *Premature Chromosome Condensation*) [6]. Może to prowadzić do nieskoordynowanej replikacji DNA powodującej powstawanie anomalii chromosomowych oraz zaburzeń ploidi jądra w zrekonstruowanych zarodkach. Uzależnione to jest od fazy cyklu komórkowego wprowadzanego jądra. Jeśli PCC ulega jądro w fazie G1, dochodzi do skoordynowanej replikacji DNA bez powodowania uszkodzeń chromatyny. Natomiast jeśli wprowadzone jądro jest w fazie S lub G2, dochodzi do zaburzeń w koordynacji replikacji DNA, czego konsekwencją jest re-replikacja genomu i wysoka częstotliwość anomalii chromosomowych [5]. Molekularne podstawy kontroli procesu replikacji DNA w cyklu komórkowym muszą przebiegać w ściśle wyodrębnionym przedziale czasu, co ma wpływ na oocyt. Faza G1 jest okresem, w którym zapada decyzja, czy cykl będzie

kontynuowany i zakończony pełnym podziałem (pierwszy punkt kontrolny). Ponadto przedwczesna inicjacja syntezy DNA w komórce nieprzygotowanej pod względem energetycznym lub pozbawionej odpowiedniego zestawu enzymatycznego grozi możliwością powstania błędu replikacyjnego [15, 20]. Zmiany stanu metabolicznego komórki sprzężone są w tym systemie z kaskadowymi reakcjami wyzwalanymi przez kinazy MAP, modyfikacje aktywatorów i represorów głównych kinaz białkowych cyklu komórkowego oraz fosforylację i defosforylację kompleksów podczas każdej fazy S. Komórki eukariotyczne kopiują swoje chromosomy wykorzystując jednocześnie liczne miejsca inicjacji ( $10^3$  do  $10^5$  w każdym jądrze) rozmieszczone wzdłuż liniowych cząsteczek DNA, przez co cały materiał genetyczny ulega syntezie w znacznie krótszych odcinkach czasu. Taka strategia wymaga mechanizmu ochrony miejsc inicjacji funkcjonujących we wczesnych stadiach fazy S (ang. *early replicons*) przed ich ponownym uruchomieniem podczas dalszych etapów fazy S (ang. *late replicons*) w tym samym cyklu komórkowym [11]. Mitotyczny podział jądra nie może nastąpić przedwcześnie, tj. przed zakończeniem replikacji. Zapewnia to prawidłowe połączenie chromatyd siostrzanych, tworzących się podczas fazy S, z przeciwległymi biegunami wrzeciona podziałowego. Spełnienie tych warunków jest podstawą stabilnego poziomu ploidalności jąder komórkowych, a tym samym niezmienności osobniczych programów rozwojowych oraz informacji genetycznej przekazywanej w kolejnych pokoleniach. Badania nad zdolnością do replikacji DNA jądrowego, polegające na fuzji komórek w różnych stadiach interfazy wskazują, że stan kompetencji do inicjacji syntezy DNA jest wyłącznie cechą komórek w fazie G1. Ponadto obecność czynnika aktywującego, zdolnego do indukowania replikacji DNA chromosomów kompetentnych (tj. jąder w fazie G1), jest wyłącznie cechą komórek w fazie S, a jądra będące w fazie G2 nie są w stanie ponownie inicjować replikacji DNA do czasu przejścia przez mitozę.

Proces inicjacji fazy S i mitozy skorelowany jest z aktywacją czynników indukujących SPF (ang. *S-phase Promoting Factor*) i MPF. Czynniki te należą do grupy kinaz białkowych CDK, specyficznych dla fazy S (S-CDK) i mitozy (M-CDK). Brak stosownej kinazy blokuje fazę S lub mitozę, natomiast przyspieszenie aktywacji CDK prowadzi do wcześniejszej inicjacji syntezy DNA albo przedwczesnej kondensacji chromosomów (powstanie błędów). Wśród mechanizmów regulacji aktywności różnych typów CDK do najważniejszych należą zmiany w dynamice transkrypcji genów kodujących cykliny [21], różnicowanie poziomu białek inhibitorowych [33], blokowanie i fosforylacja podjednostek CDK [10], a także proteoliza cyklin. Nie jest to jedyny mechanizm kontroli replikacji – ważna jest również funkcjonalna organizacja miejsc inicjacji replikacji. Aktywność kinaz CDK prawdopodobnie chroni miejsca inicjacji przed przełączeniem w stan gotowości replikacyjnej. Warunkiem wstępnym tworzenia specyficznych wiązań z czynnikami umożliwiającymi replikację DNA, mitotyczną kondensację oraz segregację chromosomów jest określona forma przestrzenna chromatyny. Ośrodkiem regulacji zmiennej architektury genomu jest sieć struktur macierzy jądrowej. Wysoki poziom MPF w metafazie indukuje proces mitotycznej kondensacji chromosomów. Kondensacja chromatyny podczas rozpoczęcia mitozy zachodzi poprzez fosforylację histonu H1 oraz histonów H2A i H3, które zmieniając



swoją konformację prowadzą do zwiększenia stopnia zwartości chromatyny. W cytoplazmie dochodzi do depolimeryzacji mikrotubul cytoszkieletu. Powstała w ten sposób tubulina służy jako budulec dla wrzeciona podziałowego (przy udziale cykliny znajdującej się w centromerze). Prawidłowe połączenie mikrotubul z kinetochorami znajdującymi się na chromatydach siostrzanych warunkuje wytworzenie odpowiedniego naprężenia – punkt kontrolny (ang. *checkpoint*), który umożliwi komórce prawidłowe połączenie chromosomów z aparatem mitotycznym [11]. W skład aparatu mitotycznego poza wrzecionem podziałowym wchodzi także cysterny i pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej gładkiej, miozyna i aktyna oraz swoiste białka aparatu mitotycznego. Aparat mitotyczny łączy się w wielu miejscach (z wyjątkiem centrioli) z siecią włókien pośrednich, które stabilizują go przestrzennie.

Inaczej zachowują się jądra wprowadzone do oocyty po zaniku aktywności MPF. W jądrach takich nie dochodzi bowiem do NEBD i PCC, a replikacja DNA ma charakter skoordynowany bez względu na fazę cyklu komórkowego wprowadzanego jądra. Z tego powodu oocyty takie określano mianem „uniwersalnych biorców” [5, 6]. Z drugiej jednak strony wskazuje się, że NEBD i PCC są warunkiem koniecznym (ale niewystarczającym) dla prawidłowego przeprogramowania wszczepionego jądra komórki somatycznej. Przypuszcza się, że wystawienie nagiej, silnie skondensowanej chromatyny (po zejściu NEBD i PCC) oraz białek jądrowych na długotrwałe działanie czynników cytoplazmatycznych może wpływać korzystnie na przeprogramowanie i przemodelowanie zróżnicowanych jąder komórkowych. Kompleksowe przeprogramowanie jądra możliwe jest poprzez wykorzystanie w procedurze klonowania populacji komórek somatycznych znajdujących się w fazie G1/G0 [41]. Taki specyficzny stan komórek i skondensowanej chromatyny jądrowej umożliwia prawidłową reakcję wszystkich genów na sygnały płynące z cytoplazmy oocyty. Fazę G1/G0 osiągnąć można przez tzw. głodzenie komórek, czyli drastyczne obniżenie poziomu surowicy w pożywce hodowlanej lub przez sortowanie komórek w cytometrze przepływowym. W przypadku drugiej metody obserwuje się lepszy rozwój zrekonstruowanych oocytów niż w przypadku komórek populacji niesortowanej [23].

Bardzo istotnym etapem w procedurze klonowania somatycznego jest aktywacja zrekonstruowanego oocyty, a w szczególności właściwy moment jej przeprowadzenia. Stosowane są różne protokoły aktywacji przy wykorzystaniu szeregu czynników fizykochemicznych, takich jak: pole elektryczne, jonomycyna, jonofor wapnia A 23187 w połączeniu ze związkami blokującymi aktywność kinazy MPF/MAP, takimi jak 6-dimetylamino-puryna (6-DMAP) czy cykloheksymid. Najczęściej stosowany protokół aktywacji zakłada przeprowadzenie jej w kilka godzin po fuzji cytoplastu z komórką somatyczną. Taki typ aktywacji określany jest jako postaktywacja [7]. Stosowany jest również model równoczesnej aktywacji i fuzji, kiedy czynnik fuzjogenny jest równocześnie czynnikiem aktywującym [19]. Ostatnio proponowany jest model aktywacji oocyty bezpośrednio przed elektrofuzją – pre-aktywacja [32]. Jeśli wprowadzone jądra są w fazie G1/G0, stosunkowo najczęściej stosuje się równoczesną aktywację i fuzję jako metodę najprostszą technicznie [16, 25].

Prowadzone w ostatnich latach intensywne badania dotyczące interakcji jądrocytoplastycznych w rekonstruowanych oocytach przyniosą niewątpliwie rozwiązanie wielu niejasności występujących przy klonowaniu somatycznym. Nie do końca poznane są bowiem mechanizmy warunkujące przeprogramowanie jąder somatycznych w cytoplazmie oocytu-biorcy, jak również słabo poznane są zmiany morfologiczne i funkcjonalne związane z ich przemodelowaniem. Jeśli bowiem tylko jeden gen kodujący istotne białko wykazuje w krytycznym okresie nieodpowiednią ekspresję lub jej brak, to efekty klonowania są ograniczone [24, 25].

U sklonowanych zwierząt występują często zaburzenia w funkcjonowaniu układu oddechowego, krążenia, a w rozwoju płodowym zaobserwowano nieprawidłowości w budowie błon płodowych oraz łożyska. Wiele cieląt padło w czasie okołoporodowym lub po pewnym czasie od urodzenia [16, 17]. Wątpliwości budzi również wiek sklonowanych zwierząt w momencie ich narodzin. Badania nad telomerami (końcowe fragmenty chromosomów stabilizujące ich strukturę w czasie replikacji, skracające się wraz z liczbą replikacji DNA) wykazały, że są one krótsze niż u zwierząt kontrolnych będących w tym samym wieku [34]. Nie potwierdziły tego jednak badania przeprowadzone na zrekonstruowanych zarodkach bydłowych [36]. Nasuwa się przypuszczenie o możliwych różnicach gatunkowych w tym zakresie. Problem nie jest rozstrzygnięty, wydaje się bowiem, że nie tylko telomery, ale przede wszystkim jąderko jest odpowiedzialne za starzenie komórki [35].

Prawidłowe przeprogramowanie przeszczepionych jąder komórkowych wymaga wielu czynników, wydaje się więc, że opracowanie uniwersalnego schematu klonowania ssaków tą metodą może być trudne. Zanim klonowanie somatyczne stanie się jedną z metod praktycznego rozrodu zwierząt, niezbędne jest przeprowadzenie badań, które umożliwią wyjaśnienie i zrozumienie molekularnych mechanizmów przeprogramowania genomu komórek somatycznych w cytoplazmie oocytów – biorców.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRIEU A, LORCA T, LABBE J-C, MORIN N, KEYSE S, DOREE M. MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 1996; **109**: 239–246.
- [2] BAGUISI A et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 1999; **17**: 456–461.
- [3] BARNES FL, COLLAS P, POWELL R, KING WA, WESTHUSIN M, SHEPHERD D. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1993; **36**: 33–41.
- [4] BRANBURY EM. Reversible histone modification and the chromosome cell cycle. *BioEssays* 1992; **14**: 9–16.
- [5] CAMPBELL KHS, RITCHIE WA, WILMUT I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 1993; **49**: 933–942.
- [6] CAMPBELL KHS, LOI P, OTAEGUI PJ, WILMUT I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* 1996; **1**: 40–46.
- [7] CIBELLI JB, STICE S, GOLUEBE P, KANE J, JERRY J, BLACKWELL C, PONCE DE LEON, ROBL A, ROBL J. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; **280**: 1256–1258.



- [8] CHESNEL F, EPPIG JJ. Synthesis and accumulation of p34<sup>cdc2</sup> and cyclin in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol Reprod Dev* 1995; **40**: 503–508.
- [9] CHOI T, AOKI F, MORI M, YAMASHITA M, NAGAHAMA Y, KOHOMOTO K. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 1991; **113**: 789–795.
- [10] COVERLEY D, DOWNES CS, ROMANOWSKI P, LASKEY RA. Reversible effects of nuclear membrane permeabilization on DNA replication: evidence for a positive licensing factor. *J Cell Biol* 1993; **122**: 985–992.
- [11] DAHMANN C, DIFFLEY JR, NASMYTH KA. S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr Biol* 1995; **5**: 1257–1269.
- [12] FEATHERSTONE C, RUSSELL P. Fission yeast genes p107<sup>wec1</sup> mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* 1991; **349**: 808–811.
- [13] FISHER RP, MORGAN DO. A novel cyclin associates with MO15/Cdk 7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994; **78**: 713–724.
- [14] HACCARD O, SARCEVIC B, LEWELLYN A, HARTLEY R, ROY L, IZUMI T, ERIKSON E, MALLER JL. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 1993; **262**: 1262–1265.
- [15] JACOBS T. Control of the cell cycle. *Dev Biol* 1992; **153**: 1–15.
- [16] HILL JR, ROUSSEL AJ, CIBELLI JB, EDWARDS JF, HOPPER NL, MILLER MW, THOMPSON JA, LEONEY CR, WESTHUSIN ME, ROBL JM, ROBL JM, STICE SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999; **51**: 1451–1465.
- [17] KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, KUROKAWA K, KATO J, DOGUCHI H, TSUNODA Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; **282**: 2095–2098.
- [18] KUBIAK JZ, WEBER M, DE PENNART H, WINSTON NJ, MARO B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J* 1993; **12**: 3773–3778.
- [19] KUBOTA Ch, YAMAKUCHI H, TODORAKI J, MIZOSHITA K, TABARA N, BARBER M, YANG X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 990–995.
- [20] LIX, NICKLAS RB. Mitotic forces control a cell cycle checkpoint. *Nature* 1995; **373**: 630–632.
- [21] MAHER M, CONG F, KINDELBERGER D, NASMYTH K, DALTON S. Cell-cycle regulated transcription of the CLB2 gene is dependent on MCM1 and a ternary complex factor. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 3129–3137.
- [22] MASUI Y, MARKERT CL. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; **177**: 129–146.
- [23] MODLIŃSKI JA, BOCHENEK M, SMORĄG Z, REED M, KARASIEWICZ J. Cytometric separation of mouse G0/G1 embryonic stem cells and their use for cloning. *Anim Sci Rep* 1998; **16** Suppl. 1: 17–22.
- [24] MODLIŃSKI J A, KARASIEWICZ J. Wykorzystanie komórek somatycznych w klonowaniu ssaków. *Post Biol Kom* 1999; **26** Suppl.12: 9–16.
- [25] MODLIŃSKI J A, KARASIEWICZ J. Somatyczne klonowanie ssaków. *Med Wieku Rozw* 2001; **5** Suppl. 1: 9–25.
- [26] MUELLER PA, COLEMAN TR, KUMAGAI A, DUNPHY WG. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995; **270**: 86–90.
- [27] NIGG EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bio Essays* 1995; **17**: 471–480.
- [28] ONISHI A, IWAMOTO M, AKITA T, MIKAWA S, TAKEDA K, AWATA T, HANADA H, PERRY ACF. Pig cloning by mikroinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; **289**: 1188–1190.
- [29] PETER M, NAKAGAWA J, DOREE M, HABBE J-C, NIGG EA. *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specified phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 1990; **61**: 591–602.
- [30] REEVERS R. Chromatin changes during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 413–423.
- [31] SALOMON MJ, GLOTZER M, LEE TH, PHILIPPE M, KIRSCHNER MW. Cyclin activation of p34 cdc2. *Cell* 1990; **63**: 1013–1024.
- [32] SAWYER N, CUNNIFF K, MASERATI M, LEGGE K DE, DEVARAKONDA S, STREETER C, MALCUIT C, CIBELLI JB. The effects of using pre-activated ooplasts for somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2002; **57**(1): 450.
- [33] SCHWOB E, BOHM T, MENDENHALL MD, NASMYTH K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 1994; **79**: 233–244.
- [34] SHIELDS PG, KIND AJ, CAMPBELL KHS, WADDINGTON D, WILMUT I, COLMAN A, SHNIEKE A. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 1999; **399**: 316–317.
- [35] SKOMER J. Kto ponosi winę za starzenie? Wiek a jąderko. *Wszechświat* 2000; **101**: 10–12.

- [36] TIAN XC, XU J, YANG X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nature Genetics* 2000; **26**: 272–273.
- [37] VERLHAC M-H, KUBIAK JZ, CLARKE HJ, MARO B. Microtubule and chromatin behaviour follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis and mouse oocytes. *Development* 1994; **120**: 1017–1025.
- [38] VERLHAC M-H, KUBIAK JZ, WEBER M, GERAUD G, COLLEDGE WH, EVANS M, MARO B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 1996; **122**: 815–822.
- [39] WAKAYAMA T, PERRY ACF, ZUCOTTI M, JOHNSON KR, YANAGIMACHI R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; **394**: 369–374.
- [40] WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 1999; **60**: 996–1005.
- [41] WILMUT I, SCHNIEKIE AE, MC WHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KHS. Viable offspring from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; **385**: 810–813.
- [42] WÓJCIK C. Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwiny. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 295–315.
- [43] XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, KEYOMARSI K, ELLEDGE SJ. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; **366**: 236–242.

*Redaktor prowadzący – Szczepan Biliński*

*Otrzymano: 12.10.2001 r.*

*Przyjęto: 05.02.2002 r.*

*32-083 Balice/Kraków*

*mbryla@izoo.krakow.pl*



## ROLA MAKROFAGÓW W UKŁADZIE ROZRODCZYM SSAKÓW: OD PAULA EHRLICHA DO WSPÓŁCZESNEJ IMMUNOLOGII ROZRODU

THE ROLE OF MACROPHAGES IN MAMMALS REPRODUCTIVE  
TRACT: FROM PAUL EHRLICH TO PRESENT IMMUNOLOGY  
OF REPRODUCTION

Marta WOJCIECHOWSKA\*, Marek NIEMIAŁTOWSKI

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

*Streszczenie.* Poród u ssaków prowadzi do wyjścia płodu ze sterylnej, w normalnych warunkach, macicy do środowiska zewnętrznego, gdzie noworodek narażony jest na kontakt z różnymi czynnikami zakaźnymi (bakterie, wirusy i grzyby chorobotwórcze). Ochronę przeciwko patogenom zapewnia układ immunologiczny, a także wiele humoralnych i komórkowych mechanizmów odporności wrodzonej. Makrofagi należą do komórek prezentujących antygen. Uczestniczą w procesie fagocytozy, zapewniając nieswoistą obronę przeciwko czynnikom zakaźnym. W układzie rozrodczym zarówno męskim, jak i żeńskim makrofagi uczestniczą na poziomie komórkowym i molekularnym w istotnych dla rozrodu procesach. Wielkość populacji makrofagów oraz ich aktywność biologiczna podlegają kontroli hormonalnej, w tym estrogenów i progesteronu, które z kolei, regulują ilość M-CSF (zwanego również CSF-1), który jest czynnikiem chemotaktycznym dla makrofagów. U samców komórki te biorą udział w regulacji steroidogenezy w jądrze. W żeńskim układzie rozrodczym makrofagi zasiedlają jajnik, jajowód, macicę, szyjkę macicy i pochwę. W jajniku uczestniczą w follikulogenezie i oogenezie oraz w tworzeniu i funkcjonowaniu ciała żółtego. Najważniejszą funkcją makrofagów obecnych w jajowodzie jest wpływ na transport oocyta i zarodka, za pośrednictwem cytokin i prostaglandyn działających na komórki nabłonka jajowodu i warstwę mięśni gładkich. Cytokiny wydzielane przez makrofagi zasiedlające macicę uczestniczą w rozwoju przedimplantacyjnym oraz w procesie implantacji zarodka. Makrofagi obecne w śluzie szyjki macicy i pochwy tworzą komórkową linię obrony, której najważniejszymi mechanizmami są fagocytoza i prezentacja antygeny. Niektóre cytokiny wytwarzane przez makrofagi w szyjce macicy mogą wpływać na jej relaksację, co umożliwia poród. W niniejszej pracy przedstawiono w zarysie obecny stan wiedzy na temat roli makrofagów i niektórych cytokin w układzie rozrodczym ssaków.

\*Doktorantka na Dziennym Studium Doktoranckim „*mikrobiologia i immunologia*” (kierownik: prof.dr hab. M.Niemiałtowski) przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW.

*Słowa kluczowe:* układ rozrodczy, makrofagi, cytokiny.

*Summary:* In mammals, the delivery means introduction of the newborn to environment where it is exposed to various pathogenic agents (bacteria, viruses and fungi). Protection against pathogens is provided by the immune system and also by many humoral and cellular mechanisms of innate immunity. Macrophages are classified as professional antigen presenting cells. They are involved in phagocytosis, thereby provide non-specific protection against infectious agents. These multifunctional cells are also present in the reproductive system of both male and female mammals, where they are involved in the process of reproduction at cellular and molecular level. The macrophage population and function is under control of estrogens and progesterone, which regulate the amount of monocyte-macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; CSF-1), which apparently is a macrophage chemoattractant. In males, macrophages participate in the regulation of steroidogenesis. In females, ovaries, oviducts, uterus, cervix and vagina are locations, which macrophages may inhabit. They actively participate in folliculogenesis and oogenesis as well as in formation and function of the *corpus luteum*. The most significant role of oviductal macrophages is their effect on oocyte and embryo transport achieved through cytokines and prostaglandins activity on the oviduct epithelium and smooth muscle layer. Cytokines secreted by uterine macrophages contribute to the preimplantation development and subsequent embryonic implantation. Cervical and vaginal mucosal macrophages form a cellular defence mainly evidenced by phagocytosis and antigen presentation. Moreover, particular cytokines produced by cervical macrophages allow relaxation of the cervical muscles, important for parturition. This minireview discusses the current knowledge on the role of macrophages and influence of particular cytokines on reproduction in mammals.

*Key words:* reproductive system, macrophages, cytokines

*Wyjaśnienie użytych skrótów:* **APC** (*antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen; **CR** (*complement receptor(s)*) – receptor(y) dla składników dopełniacza; **CSF-1** (*colony stimulating factor-1*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii-1; **EGF** (*epidermal growth factor*) – nabłonkowy czynnik wzrostowy; **FcR** (*Fc receptor(s)*) – receptor(y) Fc; **FGF** (*fibroblasts growth factor*) – czynnik wzrostowy fibroblastów; **FSH** (*follicle stimulating hormone*) – hormon dojrzewania pęcherzyków jajnikowych; **GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; **ICAM-1** (*intracellular adhesion molecule*) – wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna; **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **LH** – luteinizujący hormon, hormon luteinizujący; **LPS** (*lipopolysaccharide*) – lipopolisacharyd; **Mf** (*macrophage(s)*) – makrofagi; **MAdCAM-1** (*mucosal addressin cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji błon śluzowych będąca adresyną błon śluzowych; **MARKCS** (*myristylated alanine-rich C kinase substrate*) – myristolowany substrat kinazy C bogaty w alaninę; **M-CSF** (*macrophage-colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; **MCP** (*monocyte chemoattractant protein*) – białko chemoaktywne monocytów; **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny kompleks zgodności tkankowej; **MIF** (*migration inhibitory factor*) – czynnik hamujący migrację makrofagów; **IP** (*macrophage inhibitory protein*) – białko hamujące makrofagi; **MR** (*mannose receptors*) – receptory mannozowe; **PGE** – prostaglandyna E; **PKC** (*protein kinase C*) – kinaza białkowa C; **R A N T E S** (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*) – cząsteczki powierzchniowe na stymulowanych limfocytach T; **sIgA** (*soluble IgA*) – wydzielnicze IgA; **TGF** (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu; **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu; **VAP-1** (*vascular adhesion protein*) – naczyniowe białko adhezyjne; **V-CAM-1** (*vascular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń.



## 1. WSTĘP

Natychmiast po porodzie, noworodek musi być przygotowany do nowych, trudnych i niebezpiecznych warunków bytowania poza organizmem matki, która podczas ciąży asystowała mu immunologicznie. Powinna to czynić również po porodzie, przekazując mu przez wydzielinę gruczołu mlekowego składniki odporności nieswoistej i swoistej (humoralnej i komórkowej). Arthur M. Silverstein w swoim artykule „*The most elegant immunological experiment of the XIX century*” opublikowanym w roku 2000 w *Nature Immunology* [37], opisuje doświadczenie przeprowadzone przez Paula Ehrlicha (1854–1915). Ten znakomity badacz, zafascynowany odkryciem przeciwciał („*anti-bodies*”) przez Emila Behringa i Shi-basaburo Kitasato, stwierdził w swoim *experimentum crucis*, że tylko potomstwo pochodzące od uodpornionych myszy było chronione przed działaniem toksyny błoniczej. W artykule „*On immunity by inheritance and suckling*”, opublikowanym w roku 1892 (cyt. za [37]) Ehrlich podzielił odporność na bierną i czynną. Od tamtego czasu wiele się zmieniło w naszym rozumieniu immunologii rozrodu i mechanizmów z nią związanych. W procesie tym wiele komórek, w tym i makrofagi, bierze udział w zapewnieniu nie tylko niezbędnej obrony przed patogenami, ale także w regulacji mechanizmów koordynujących procesy rozrodcze i rozwój płodu.

## 2. MAKROFAGI: CHARAKTERYSTYKA I FUNKCJE PEŁNIONE W ORGANIZMIE

Makrofagi należą do fagocytów jednojądrzastych. Powstają w szpiku kostnym z komórek macierzystych. W wyniku dojrzewania i aktywacji mogą uzyskiwać różnorodne formy morfologiczne. Pierwszym typem komórek, które migrują do krwi obwodowej po opuszczeniu szpiku kostnego, są promonocyty. Średnica monocytów waha się od 13 do 25  $\mu\text{m}$ , charakteryzują się one nerkowatym jądrem oraz licznymi kwasochłonnymi ziarnistościami w cytoplazmie, wśród których wyróżnia się lizosomy, fagocytyjące wakuole oraz fragmenty cytoszkieletu. W ciągu 24 godzin opuszczają łożysko naczyniowe i zasiedlają tkanki, gdzie dojrzewają i stają się makrofagami. Migracja tych komórek do miejsca inicjowanej odpowiedzi zapalnej lub reakcji immunologicznej przebiega na skutek działania szeregu cząsteczek chemotaktycznych, takich jak: fragmenty dopełniacza C5a i C3a, uwalniane przez bakterie formylowane peptydy, a także chemokiny, takie jak: MCP-1 i MIP-1 $\alpha$  oraz niektóre czynniki wzrostowe, jak np. TGF- $\beta$  [15, 26, 36].

Do najsilniejszych czynników pobudzających makrofagi należy IFN- $\gamma$ , który może współpracować z innymi aktywatorami, takimi jak: MIF, GM-CSF oraz IL-2. W pierwszym etapie aktywacji wzmocnieniu ulega sekrecja enzymów lizosomalnych,

wzmaga się aktywność fagocytarna oraz ulegają ekspresji receptory błonowe. W drugim etapie obserwuje się zwiększenie rozmiarów komórki, zdolność do przemieszczania się, a także fagocytozy, aktywności bakteriobójczej oraz zwiększenie ekspresji białek MHC klasy II, co jest szczególnie istotne przy prezentacji antygeny.

Makrofagi zasiedlają różne tkanki i mogą być zróżnicowane fenotypowo i funkcjonalnie, w zależności od typu tkanki docelowej. W związku z tym wyróżnia się makrofagi wątrobowe (dawniej zwane komórkami Kupfera), histiocyty w tkance łącznej, osteoklasty w tkance kostnej, a także makrofagi płucne i makrofagi ośrodkowego układu nerwowego, które wchodzi w skład mikrogleju. Duże ilości tych komórek zasiedlają także zatoki śledziony, szpik kostny oraz węzły chłonne i jamę otrzewnej. Jednakże, niezależnie od nazwy czy lokalizacji w organizmie, są one makrofagami i należą do układu fagocytów jednojądrzastych [5, 16].

Układ fagocytów jednojądrzastych reprezentuje populację komórek niezwykle istotnych dla odporności nieswoistej, które biorą także udział w swoistej odpowiedzi immunologicznej. Funkcje pełnione przez makrofagi w odporności nieswoistej to przede wszystkim fagocytoza obcych cząsteczek, takich jak: mikroorganizmy, makrocząsteczki oraz własne komórki organizmu, które zostały uszkodzone lub obumarły, jak np. starzejące się erythrocyty. Komórki te są również zdolne do wewnątrzkomórkowego zabijania patogennych drobnoustrojów w drodze wybuchu tlenowego [1]. Makrofagi służą zatem jako jedne z głównych komórek oczyszczających organizm, w tym z komórek, które uległy apoptozie. Oprócz tego, komórki te wydzielają różne enzymy, między innymi kolagenazy, arginazy, lipazy i nukleazy, poza tym reaktywne formy tlenu oraz tlenek azotu. Wszystkie te związki mają zdolność zabijania mikroorganizmów oraz przeciwdziałają rozprzestrzenianiu się zakażenia. Istotnymi produktami wydzielanymi przez makrofagi są również prostaglandyny.

Makrofagi pełnią także istotną rolę jako komórki wydzielające szereg ważnych białek regulatorowych, w tym cytokin. Do najważniejszych cytokin przez nie wytwarzanych należy TNF i IL-1. Ta ostatnia jest niezbędna do inicjacji odpowiedzi immunologicznej i aktywuje limfocyty. Ma ona zdolność aktywacji limfocytów T pomocniczych (Th2) oraz indukuje wytwarzanie przez te komórki innych cytokin, takich jak: IL-4, IL-5 i IL-10. Tym samym makrofagi biorą aktywny udział w odpowiedzi humoralnej. Do cytokin wytwarzanych przez makrofagi należą także IL-6 i IL-12. IL-6 aktywuje limfocyty B i stymuluje je do wytwarzania przeciwciał, ma także zdolność pobudzania hepatocytów i fibroblastów. Z kolei, IL-12 działa podobnie jak IL-1, aktywując wybiórczo limfocyty Th1 odpowiedzialne za rozwój odpowiedzi komórkowej. Makrofagi wytwarzają również czynniki wzrostowe TNF i EGF dla fibroblastów i nabłonka naczyniowego, co ułatwia naprawę uszkodzonych tkanek [36]. Ważną cytokiną produkowaną przez makrofagi jest także IL-10, działająca przeciwzapalnie. Ma ona zdolność do hamowania produkcji cytokin przez monocyty, makrofagi i limfocyty Th1, a także hamowania wytwarzania reaktywnych form tlenu. Może także hamować proliferację limfocytów Th1 [36].

W swoistej odpowiedzi immunologicznej makrofagi funkcjonują jako komórki zarówno towarzyszące, jak i efektorowe [1]. Mają zdolność prezentacji antygeny



limfocytom T CD4<sup>+</sup> w połączeniu z białkami MHC klasy II. W efektorowej fazie odpowiedzi komórkowej pobudzone limfocyty T wydzielają cytokiny aktywujące makrofagi, z których najsilniej działa TGF- $\beta$ . Aktywowane monocyty/makrofagi, podobnie jak neutrofile, mają większą zdolność do fagocytozy i niszczenia niepotrzebnych własnych lub obcych antygenów niż komórki nieaktywowane. Przykładowo, w efektorowej fazie odpowiedzi patogeny ulegają fagocytozie przy udziale receptorów, takich jak:

- (i) receptory mannozowe (MR),
- (ii) receptory dla dopełniacza (CR) po nieswoistej opsonizacji dopełniaczem,
- (iii) receptory dla Fc (FcR) po swoistej opsonizacji przeciwciałami [1, 36].

Wymienione receptory współdziałają ze sobą oraz z aktywną cytoszkieletu makrofaga, co prowadzi do fagocytozy pochłanianej cząsteczki. Wiadomo obecnie, że wiele składników cytoszkieletu komórki uczestniczy w procesie przylegania, gromadząc się biegunowo w błonie komórkowej – do cząsteczek tych zaliczamy, między innymi, talinę, winkulinę,  $\alpha$ -aktynę, kinazę białkową Ca oraz MARCKS. Wiele receptorów powierzchniowych wykazuje podwójną funkcję uczestnicząc zarówno w przyleganiu, jak i pochłanianiu cząsteczek podlegających temu procesowi. Oczywiście, nie tylko monocyty/makrofagi, ale również inne komórki (np. granulocyty obojętnochłonne) wykazują aktywność fagocytarną w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Co więcej, transfekcja fibroblastów (będących komórkami o znikomych właściwościach żernych) cDNA kodującym FcR wzmacnia znacząco zdolność tych komórek do fagocytozy [1].

### 3. ROZMIESZCZENIE I FUNKCJE MAKROFAGÓW W NARZĄDACH ROZRODCZYCH SŚAKÓW

Makrofagi osiadłe w tkankach wytwarzają szereg białek, takich jak: cytokiny, proteazy oraz inhibitory enzymów, między innymi metaloproteinaz. Udowodniono, iż makrofagi, oprócz swoich funkcji obronnych w organizmie, biorą także udział w regulacji procesów zachodzących w komórkach narządów niepowiązanych z układem immunologicznym [32].

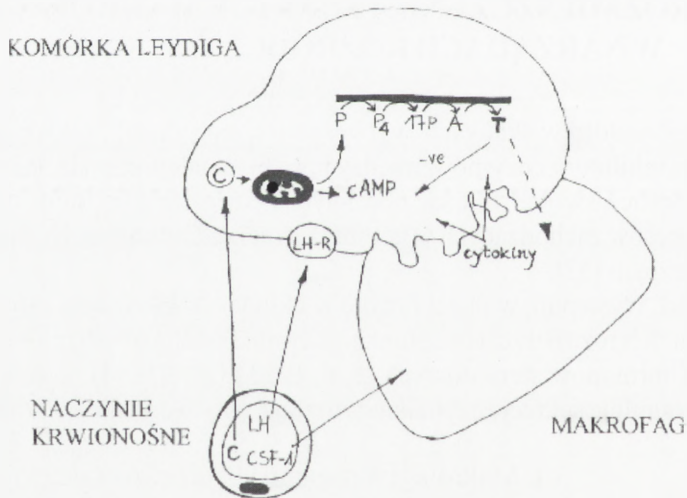
Makrofagi występują w dużej liczbie w układzie rozrodczym zarówno męskim, jak i żeńskim. Ich rozmieszczenie i funkcjonowanie podlega wahaniom, w zależności od poziomu hormonów steroidowych [5, 6, 17, 34, 38, 41, 44]. Z kolei, estrogeny i progesteron regulują sekrecję czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów.

#### 3.1. Makrofagi w męskim układzie rozrodczym

Makrofagi w jądrach stanowią około 20% komórek tkanki śródmiąższowej, jednak nie wykryto ich w świetle kanalików nasieniowców. Jądrowe makrofagi występują w bliskim sąsiedztwie komórek śródmiąższowych (Leydiga), produkujących hormony steroidowe. Ich wzajemne oddziaływanie są możliwe na skutek bliskiego kontaktu pomiędzy oboma typami komórek, połączonych układem mikrokosmków i zagłębień

[5]. Makrofagi jądrowe biorą udział w regulacji steroidogenezy przez komórki śródmiąższowe (ryc. 1). Za pośrednictwem cytokin, głównie IL-1, TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ , makrofagi mogą regulować ilość mRNA dla cytochromu P450c17, z udziałem którego zachodzi przekształcanie progesteronu w testosteron. Zwiększony napływ makrofagów, na skutek podwyższonego poziomu LH, w pobliżu komórki śródmiąższowej, doprowadza do supresji aktywności cytochromu P450c17 [27]. Wzrost produkcji cytokin przez makrofagi zasiedlające jądro następuje po stymulacji, między innymi, przez IFN- $\gamma$  [20]. Czynniki hamujące migrację makrofagów (MIF), ma zdolność przełamywania supresyjnego działania hormonów steroidowych na produkcję cytokin prozapalnych. Oprócz tego przypisuje mu się rolę pośrednika w oddziaływaniach pomiędzy komórkami Leydiga a nabłonkiem kanalikula nasiennego. MIF ma zdolność, między innymi, doprowadzania do supresji wytwarzania inhibiny przez ten nabłonek [29]. Ostatnie badania dowodzą bezpośredniego udziału makrofagów w produkcji hormonów steroidowych [27]. Makrofagi produkują bowiem 25-hydroksycholesterol, który może być przekształcany w testosteron przez komórki Leydiga. Ponadto, w jądrowych makrofagach wykryto mRNA dla hydroksylazy 25-cholesterolu, która jest odpowiedzialna za przekształcanie cholesterolu, przenikającego z naczyń krwionośnych, w 25-hydroksycholesterol, który drogą wielu reakcji enzymatycznych, poprzez pregnenolon, progesteron i androstenodion, przekształcany jest w testosteron [5].

Oprócz regulacji funkcji parakrynowej komórek śródmiąższowych, makrofagi biorą także udział w utrzymaniu właściwej struktury i funkcjonowania tych komórek. U



RYCINA 1. Współdziałanie makrofaga (Mf) i komórki Leydiga (adaptowane z [5]): C – cholesterol, P – pregnenolon, P4 – progesteron, 17P – 17a-hydroksyprogesteron, A – androstenodion, T – testosteron, ● – boczny łańcuch cytochromu P450, ████████ – enzymy szlaku syntezy testosteronu



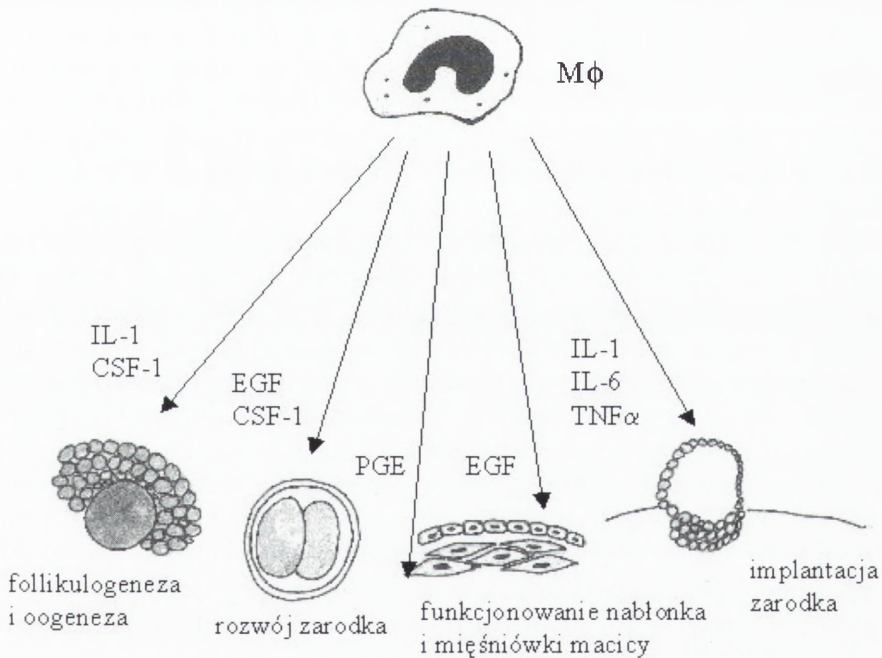
myszy doświadczalnie pozbawionych genów dla CSF-1, zaobserwowano zaburzenia w strukturze komórek śródmiąższowych, między innymi nieprawidłowości w budowie siateczki śródplazmatycznej, a także nieprawidłowości w produkcji i sekrecji steroidów [5, 30, 32].

Makrofagi zasiedlające jądra mają także zdolność prezentacji antygeny limfocytom T, wykazują również typowe cechy komórek fagocytarnych. Mechanizm fagocytozy jest szczególnie istotny w procesie spermatogenezy, kiedy to makrofagi fagocytują pozostające resztki komórkowe, nie dopuszczając do rozwoju procesu zapalnego [5]. Prezentacja antygeny w jądrach jest hamowana, co zapobiega wystąpieniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko plemnikom.

### 3.2. Makrofagi w żeńskim układzie rozrodczym

#### 3.2.1. Rozmieszczenie i funkcje makrofagów w jajniku

Jajniki wszystkich gatunków ssaków są obficie zasiedlone przez makrofagi. Komórki te są homologiczne funkcjonalnie do makrofagów jądrowych, biorąc, między innymi, udział w regulacji steroidogenezy [32, 33]. Regulatorem napływu i rozmieszczenia makrofagów w jajniku jest CSF-1, który, z kolei, podlega wpływowi estrogenów i progesteronu [5, 33] (ryc. 2).



RYCINA 2. Funkcje makrofagów w żeńskim układzie rozrodczym (objaśnienia podano w tekście)

U myszy, makrofagi zasiedlają jajnik już w okresie życia płodowego, a ich liczba wzrasta w miarę dojrzewania organizmu [18, 24]. Rozmieszczenie makrofagów w jajniku zmienia się podczas cyklu płciowego. W komórkach zrębu łącznotkankowego, pomiędzy rozwijającymi się pęcherzykami jajnikowymi, stanowią jedną z istotnych populacji komórek. W zdrowych pęcherzykach nie obserwowano ich obecności w warstwie komórek ziarnistych, za to w miarę ich dojrzewania makrofagi zasiedlały zewnętrzną warstwę komórek osłonki pęcherzyka [3, 5, 22, 33, 40, 41]. Po zasiedleniu warstwy komórek osłonki, wkrótce po powstaniu pęcherzyka antralnego, makrofagi mogą aktywnie uczestniczyć w dalszych, strukturalnych i funkcjonalnych przemianach w obrębie pęcherzyka. Jednym z przejawów ich aktywności jest kontrola ekspresji receptora dla LH w różnych rejonach jajnika. Pojawienie się LH-R na komórkach osłonki pęcherzyka uważane jest za kluczowe wydarzenie w trakcie jego rozwoju, ponieważ może wpływać na selekcję dojrzewającego pęcherzyka. Tym samym może dojść do rozwoju jednego, dominującego pęcherzyka jajnikowego. Makrofagi przejawiają swoje działanie za pośrednictwem cytokin, z których IL-1 zdolna jest do hamowania rozwoju receptorów LH na niedojrzałych komórkach warstwy ziarnistej. Makrofagi nie dopuszczają zatem do luteinizacji niedojrzałych pęcherzyków. Za pośrednictwem cytokin, np. TNF- $\alpha$ , makrofagi mogą również uczestniczyć w owulacji oraz w procesie oogenezy, o czym świadczy obecność na oocytych receptorów, między innymi dla IL-1 i CSF-1 [3, 10, 24, 32, 33].

Po owulacji obserwuje się gwałtowny napływ makrofagów do wnętrza pęcherzyka jajnikowego. W ciałku żółtym makrofagi występują przez cały okres jego trwania, a ich rozmieszczenie podlega regulacji w trakcie cyklu jajnikowego. Zaobserwowano dwu- do trzykrotny wzrost ich liczby do połowy fazy lutealnej cyklu jajnikowego [33, 41]. W trakcie rozwoju ciałka żółtego, makrofagi zasiedlające dotąd osłonkę pęcherzyka migrują do warstwy komórek ziarnistych i są tam hormonalnie stymulowane do produkcji cytokin. Fagocytując resztki komórkowe makrofagi nie dopuszczają do rozwinięcia się procesu zapalnego, chronią również wnętrze pęcherzyka przed ewentualnym zakażeniem [3, 5, 33, 40, 41]. Makrofagi uczestniczą w regresji ciałka żółtego, po uprzedniej ich aktywacji przez limfocyty T. Są odpowiedzialne za usuwanie starzejących się, złuteinizowanych komórek warstwy ziarnistej. Oprócz tego, za pośrednictwem wytwarzanych przez makrofagi cytokin (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) dochodzi do hamowania sekrecji przez te komórki estrogenu i progesteronu [40]. Makrofagi fagocytują również komórki warstwy ziarnistej, ulegające apoptozie [17, 39, 41].

Jak już wspomniano, makrofagi mogą uczestniczyć w regulacji procesu steroidogenezy. Regulacja ta przebiega za pośrednictwem parakrynowych czynników wydzielanych przez te komórki, z których najistotniejszy wydaje się TNF- $\alpha$ . Ma on zdolność modulowania aktywności kluczowych enzymów steroidogenezy, 17- $\alpha$ -hydroksylazy i liazy 17:20, a tym samym wpływa na biosyntezę androgenu przez komórki osłonki pęcherzyka [2, 32].

Makrofagi i ich produkty pełnią również specyficzne funkcje w stanach patologicznych jajnika, takich jak nowotwory. Główną ich funkcją w nowotworach jajnika



jest wytwarzanie czynników promujących angiogenezę, takich jak: VEGF, FGF, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  oraz PDGF. Oprócz tego mogą wydzielać enzymy wpływające na uwalnianie z substancji międzykomórkowej czynników wzrostowych ułatwiających angiogenezę [31].

### 3.2.2. Funkcje makrofagów zasiedlających jajowody

Wyniki badań Givan i wsp. [7] oraz Suenaga i wsp. [38] dowodzą obecności makrofagów w jajowodach w trakcie całego cyklu płciowego. Populacja makrofagów zasiedlających nabłonek i mięśniówkę gładką jajowodu pochodzi z krwi obwodowej, a napływ regulowany jest przez lokalne czynniki chemotaktyczne, takie jak CSF-1. Ich liczba wzrasta w fazie diestrus cyklu oraz we wczesnej fazie wydzielniczej.

Transport oocytów i zarodków umożliwiają skurcze mięśniówki gładkiej i ruchy urzęsionego nabłonka jajowodu. Nabłonek znajduje się pod kontrolą hormonalną estrogenów i progesteronu, które regulują zachodzenie zmian morfologicznych. Oprócz tego, na komórki nabłonka mają również wpływ czynniki wzrostowe wydzielane przez makrofagi, między innymi EGF [23]. Z kolei, mięśniówka gładka jajowodu podlega działaniu prostaglandyn, głównie z grupy E, które są wytwarzane przez makrofagi. Oprócz regulacji kurczliwości, makrofagi uczestniczą także w regeneracji błony mięśniowej, fagocytując obumierające komórki [38].

Makrofagi zasiedlające jajowód mogą również oddziaływać na rozwój zarodka, którego pierwsze podziały i rozwój przedimplantacyjny odbywa się w jajowodzie [27]. Kontrola funkcji i rozwoju komórek odbywa się za pośrednictwem cytokin, między innymi IL-1, TNF- $\alpha$  i CSF-1 [39] oraz czynników wzrostowych, jak np. EGF [23], stymulujących rozwój zarodka.

### 3.2.3. Rozmieszczenie i funkcje makrofagów w macicy

Zrąb łącznotkankowy błony śluzowej macicy jest obficie zasiedlony przez makrofagi, których liczba waha się w zależności od fazy cyklu płciowego. U samic nieciążarnych stanowią one około 10% komórek macicy, podczas gdy w czasie ciąży ich liczba wzrasta do około 20%. Występują one obficie wokół naczyń krwionośnych, ujęć gruczołów w endometrium oraz w myometrium, gdzie zgromadzone są w tkance łącznej wokół włókien mięśniowych [28]. Dotyczy to macicy zarówno nieciążarnej, jak i ciężarnej.

Liczba makrofagów w macicy podlega wpływowi hormonów. Hormony, z kolei, regulują syntezę CSF-1 przez komórki nabłonka macicy. Jest on syntetyzowany w odpowiedzi na wzrastające stężenie 17- $\beta$ -estradiolu. Wzrost poziomu mRNA dla CSF-1 oraz samego białka obserwowano w fazie estrus cyklu oraz pierwszego dnia ciąży. CSF-1 syntetyzowany przez komórki nabłonka macicy ma również zdolność wnikania w głąb endometrium, co umożliwia zasiedlenie przez makrofagi także warstwy komórek zrębu macicy [5, 12, 13, 21, 34]. W fazie estrus cyklu płciowego stężenie CSF-1, a tym samym liczba makrofagów jest wyższa niż w trakcie ciąży, co sugeruje ich większe znaczenie w tym właśnie okresie [18]. Oprócz CSF-1 prawdopodobnymi czynnikami chemotaktycznymi dla makrofagów są MCP-1 i MIP-1 $\alpha$ , których synteza również

podlega wpływowi estrogenów i progesteronu [21]. Zdolność regulacji migracji makrofagów przypisuje się również chemokinom, takim jak RANTES i C10 [34]. W okresie przed implantacją zarodka w macicy obserwowano wzrost ekspresji mRNA dla CSF-1 i GM-CSF, prawdopodobnie w odpowiedzi na pojawienie się nasienia w drogach rodnych [39]. Napływ makrofagów w tym okresie prawdopodobnie ma na celu zapewnienie obrony przeciwko potencjalnym patogenom, mogącym wnikać wraz z nasieniem. Oprócz tego, makrofagi, jako komórki zdolne do fagocytozy, usuwają nieżywe plemniki i inne zanieczyszczenia. Napływ makrofagów do macicy może być przejawem przygotowania do ewentualnej implantacji zarodka.

W ostatnich latach wykazano, iż na liczebność populacji makrofagów w macicy wpływ mają czynniki niepowiązane z układem immunologicznym. U myszy, którym w trakcie doświadczenia ograniczano ilość pożywienia, zaobserwowano spadek liczby makrofagów oraz nieprawidłowości w ich funkcjonowaniu [9].

Makrofagi zasiedlające macicę wytwarzają cytokiny mające korzystny wpływ na rozwój zarodka przed implantacją oraz na samą implantację [34]. Do związków takich należy CSF-1, dla którego receptory znajdują się na trofoblaście, przez co może on wpływać na proliferację jego komórek, a tym samym na rozwój zarodka. Istotną rolę w tym procesie odgrywa także TNF- $\alpha$  oraz MIF, dla którego receptory znajdują się na zygocie, zarodkach 2- i 8-komórkowych oraz na blastocyste. Sugeruje to udział tego czynnika w rozwoju zarodka. TNF- $\alpha$  produkowany przez makrofagi macicy jest głównym czynnikiem wzrostu i różnicowania komórek trofoblastu, zanim zarodek podejmie własną syntezę tej cytokiny [41]. W procesie implantacji udział bierze tzw. system IL-1, składający się z IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz receptora dla IL-1 [5, 28]. W późniejszym etapie ciąży TNF- $\alpha$  powoduje ograniczanie nacieku błony mięśniowej macicy przez trofoblast, oprócz tego bierze udział w wywołaniu porodu [42]. Prostaglandyny wytwarzane przez makrofagi mogą, z kolei, regulować kurczliwość błony mięśniowej macicy w okresie poprzedzającym poród [28].

Zrąb łożyska jest również obficie zasiedlony przez makrofagi, które w normalnych warunkach nie przekraczają bariery łożyskowej i nie przechodzą do tkanek płodu [42]. Wytwarzają one w dużych ilościach TNF- $\alpha$ , który może wpływać, między innymi, na różnicowanie komórek łożyska. Oprócz tego wykazano wpływ TNF- $\alpha$  na uwalnianie gonadotropiny kosmówkowej, udział w procesie angiogenezy i ułatwianie migracji komórek trofoblastu [42].

Oprócz właściwości wspomnianych wyżej, makrofagi obecne w macicy są zdolne do fagocytozy, wykazują aktywność bakteriobójczą oraz prezentują antygen limfocytom T. Prezentacja antygeny podlega wpływowi hormonów płciowych i cytokin oraz jest zależna od fazy cyklu płciowego [5]. W badaniach na szczurach wykazano, iż w fazie proestrus, kiedy zwiększony jest poziom estradiolu we krwi, prezentacja antygeny przez komórki obecne w zrębie macicy jest intensywniejsza w porównaniu z fazami estrus i diestrus. Estradiol, z kolei, wpływa na syntezę i sekrecję IL-6, która również powoduje wzmocnienie prezentacji antygeny. Natomiast najniższy poziom prezentacji antygeny zaobserwowano w fazie estrus, kiedy zachodzi owulacja i istnieje prawdopodobieństwo obecności nasienia w drogach rodnych samicy [34]. Tym samym



ograniczone zostaje ryzyko wystąpienia odpowiedzi immunologicznej przeciwko plemnikom.

Pomimo znacznej ilości informacji dalsze badania wydają się konieczne dla ustalenia pozostałych funkcji pełnionych przez te komórki w macicy zarówno w trakcie cyklu jajnikowego, jak i w czasie ciąży.

#### 3.2.4. Makrofagi zasiedlające szyjkę macicy i pochwę

Wydzielina śluzówki szyjki macicy i pochwy stanowi pierwszą linię obrony przeciwko patogennym mikroorganizmom. W reakcjach obronnych na powierzchni śluzówki udział biorą zarówno mechanizmy humoralne, takie jak: wydzielnicze IgA (sIgA) oraz komórkowe (makrofagi, limfocyty T i granulocyty). Mechanizmem obronnym, który przeważa w tym odcinku układu rozrodczego, jest prezentacja przetworzonego, obcego antygeny limfocytom T przez komórki obecne zarówno w nabłonku, jak i w zrębie błony śluzowej [15].

Napływ leukocytów, w tym różnych populacji limfocytów i makrofagów do błony śluzowej, kontrolowany jest przez czynniki adhezyjne i adresyny, które pojawiają się w nabłonku naczyń krwionośnych i służą jako ligandy dla receptorów zasiedlania na powierzchni leukocytów. Należą do nich takie cząsteczki, jak: MAdCAM-1, ICAM-1, VAP-1, a także selektyny P i E [15].

Zasadniczą funkcją makrofagów w tej części żeńskiego układu rozrodczego jest prezentacja antygeny limfocytom T, w połączeniu z białkami MHC klasy II oraz fagocytoza ewentualnych patogenów, ale także i plemników, pozostałych po kopulacji [7, 8, 35, 45].

Prezentacja antygeny w pochwie i szyjce macicy znajduje się pod kontrolą hormonalną i zmienia się w zależności od fazy cyklu płciowego. Zaobserwowano hamujący wpływ estradiolu na prezentację antygeny w fazie estrus. Dopiero po owulacji, kiedy zaczyna funkcjonować ciało żółte i wzrasta poziom progesteronu, zahamowanie prezentacji ulega odwróceniu. Oprócz hormonów, na poziom prezentacji antygeny wpływają również cytokiny, między innymi IFN- $\gamma$  i IL-6, których poziom regulowany jest przez odpowiednie stężenie estradiolu [19, 35, 44].

Z dotychczas prowadzonych badań można wywnioskować, iż pozostająca pod wpływem hormonów supresja prezentacji antygenów przez komórki rozpoznające ogranicza rozwój odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko plemnikom. Tym samym, nie dopuszcza się do powstania niepłodności na tle immunologicznym [35, 44]. Ponadto, same makrofagi produkują TNF- $\alpha$ , mający supresyjne działanie na inne komórki aktywne immunologicznie, takie jak komórki NK, co również chroni plemniki przed zniszczeniem [6].

Oprócz roli w obronie organizmu przeciwko patogenom, makrofagi obecne w szyjce macicy biorą udział w zjawiskach związanych z funkcjonowaniem układu rozrodczego. Przed porodem obserwuje się napływ tych komórek do tkanki łącznej szyjki macicy, którego regulatorem jest IL-1 $\alpha$ . Z kolei, na skutek działania IL-1 $\alpha$  i IL-8 zwiększa się w szyjce macicy stężenie metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, niezbędnych

do rozkładu kolagenu. Enzym ten z kolei wpływa na zmiękczenie i relaksację szyjki macicy. Jest to oznaką zbliżającego się porodu [28].

#### 4. MAKROFAGI A NIEPŁODNOŚĆ NA TLE IMMUNOLOGICZNYM

Makrofagi obecne w układzie rozrodczym mogą również uczestniczyć w niektórych mechanizmach doprowadzających do niepłodności. Ich działanie może odbywać się za pośrednictwem cytokin, które mogą interferować z enzymami biorącymi udział w biosyntezie steroidowych hormonów płciowych, modulować wiązanie się gonadotropin z ich receptorami w jajniku, a także mogą wpływać na proces follikulogenezy [4]. Do takich cytokin należy TNF- $\alpha$ , którego podwyższone stężenie wykryto w płynie pęcherzykowym u kobiet ze zdiagnozowaną niepłodnością na tle immunologicznym [4]. Z kolei, u kobiet z endometriozą, zaobserwowano wzrost liczby makrofagów otrzewnowych. Komórki te mogą fagocytować plemniki, nie dopuszczając do zapłodnienia. Może również dochodzić do niszczenia oocytu lub zygoty [14].

#### POSUMOWANIE

Niniejsza praca przedstawia w zarysie obecny stan wiedzy na temat roli, jaką odgrywają makrofagi i białka regulatorowe przez nie wytwarzane (między innymi cytokiny) w procesach zachodzących w układzie rozrodczym człowieka i innych ssaków. Udział tych komórek w regulacji wytwarzania hormonów steroidowych, oogenezie, follikulogenezie oraz implantacji zarodka świadczy o czynnościowym powiązaniu układów immunologicznego i rozrodczego. Pomimo naszej, znacznej już, wiedzy na ten temat, konieczne jest prowadzenie dalszych badań dotyczących roli, jaką odgrywają makrofagi w skomplikowanych procesach zachodzących w narządach rozrodczych ssaków.

#### Podziękowanie

Praca wykonana w ramach «subsydium dla uczonych – nauki biologiczne i medyczne» [grant nr 10/2000 dla M. Niemiałtowskiego] Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] ADEREM A, UNDERHILL DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 593–623.
- [2] ANDREANI CL, PAYNE DW, PACKMAN JN, RESNICK CE, HURWITZ A, ADASHI EY. Cytokine-mediated regulation of ovarian function. Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin-supported ovarian androgen biosynthesis. *J Biol Chem* 1991; 266: 6761–6766.



- [3] BUKOVSKY A, KEENAN JA, CAUDLE MR, WIMALASENA J, UPADHYAYA NB, VAN METER SE. Immunohistochemical studies of the adult human ovary: possible contribution of immune and epithelial factors to folliculogenesis. *Am J Reprod Immunol* 1995; **33**: 323–340.
- [4] CIANCI A, CALOGERO AE, PALUMBO MA, BURRELLO N, CIOTTA L, PALUMBO G, BERNARDINI R. Relationship between tumor necrosis factor  $\alpha$  and sex steroid concentrations in the follicular fluid of women with immunological infertility. *Hum Reprod* 1996; **11**: 265–268
- [5] COHEN PE, NISHIMURA K, ZHU L, POLLARD JW. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 765–772.
- [6] FAHEY JV, PRAHBALA RH, GUYRE PM, WIRA CR. Antigen-presenting cells in the human female reproductive tract: analysis of antigen presentation in pre- and post-menopausal women. *Am J Reprod Immunol* 1999; **42**: 49–57.
- [7] GIVAN AL., WHITE HD, STERN JE, COLBY E, GOSSELIN EJ, GUYRE PM, WIRA CR. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix and vagina. *Am J Reprod Immunol* 1997; **38**: 350–359.
- [8] HILL JA, ANDERSON DJ. Human vaginal leukocytes and the effects of vaginal fluid on lymphocyte and macrophage defence functions. *Am J Obstet Gynecol* 1992; **166**: 720–726.
- [9] HUDSON SN, SEAMARK RF, ROBERTSON S.A. The effect of restricted nutrition on uterine macrophage population in mice. *J Reprod Immunol* 1999; **45**: 31–48.
- [10] HOEK A, ALLAERTS, LEENEN PJM, SCHOEMAKER J, DREXHAGE HA. Dendritic cells and macrophages in the pituitary and the gonads. Evidence for their role in the fine regulation of the reproductive endocrine response. *Eur J Endocrinol* 1997; **136**: 8–24.
- [12] HUNT JS, MILLER L, PLATT JS. Hormonal regulation of uterine macrophages. *Dev Immunol* 1998; **6**: 105–110.
- [13] HUNT JS, ROBERTSON S.A. Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J Reprod Immunol* 1996; **32**: 1–25.
- [14] JHA P, FAROOQ A, AGARWAL N, BUCKSHEE K. *In vitro* sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Am J Reprod Immunol* 1996; **36**: 235–237
- [15] JOHANSSON E-L, RUDIN A, WASSEN L, HOLMGREN J. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology* 1999; **96**: 272–277.
- [16] JOHNSON RB. Current Concepts: Immunology. Monocytes and Macrophages. *N Engl J Med* 1988; **318**: 749–752.
- [17] KASUYA K. Elimination of apoptotic granulosa cells by intact granulosa cells and macrophages in atretic mature follicles of the guinea pig ovary. *Arch Histol Cytol* 1997; **60**: 175–184.
- [18] KATABUCHI H, SUENAGA Y, OKAMURA H. Distribution and fine structure of macrophages in the human ovary during the menstrual cycle, pregnancy and menopause. *Endocr J* 1997; **44**: 785–795.
- [19] KAUSHIC C, FRAUENDORF E, ROSSOL R, RICHARDSON JM, WIRA CR. Influence of the estrus cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 1998; **39**: 2009–2016.
- [20] KERN S, ROBERTSON S.A., MAU VJ, MADDOCKS S. Cytokine production by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod* 1995; **53**: 1407–1416.
- [21] KYAW Y, HASEGAWA G, TAKATSUKA H, SHIMADA-HIRATSUKA M, ARAKAWA M, NAITO M. Expression of macrophage-colony-stimulating factor, scavenger receptors, and macrophage proliferation in the pregnant mouse uterus. *Arch Histol Cytol* 1998; **61**: 383–393.
- [22] LAWLER DF, HOPKINS J, WATSON ED. Immune cells populations in the equine *corpus luteum* throughout the estrus cycle and early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometric study. *J Reprod Fertil* 1999; **117**: 281–290.
- [23] LEE ES, FUKUI Y. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1995; **44**: 71–83.
- [24] LEUNG ST, DERECKA K, MANN GE, FLINT AP, WATHES DC. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *J Reprod Fertil* 2000; **119**: 25–33.
- [25] LI XQ, ITOH M, YANO A, XIE Q, MIYAMOTO K, TAKEUCHI Y. Distribution of F4/80-positive cells in developing ovaries in the mouse. *Arch Histol Cytol* 1998; **61**: 353–360.
- [26] LONGWORTH KE, JARVIS KA, TYLER WS. Pulmonary intravascular macrophages in horses and ponies. *Am J Vet Res* 1994; **55**: 382–385.
- [27] LUKYANENKO YO, CHEN JJ, HUTSON JC. Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells. *Biol Reprod* 2001; **64**: 760–766.
- [28] MACKLER AM, IEZZA G, AKIN MR, MCMILLAN P, YELLON SM. Macrophage trafficking in the uterus and cervix precedes parturition in the mouse. *Biol Reprod* 1999; **61**: 879–883.
- [29] MEINHARD A, BACHER M, MCFARLANE JR, METZ CN, SEITZ J, HEDGER MP, DE KRESTER DM, BUCALA R. Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* 1996; **137**: 5090–5095.

- [30] ONAMI S, MATSUYAMA S, NISHIHARA M, TAKAHASHI M. Splenic macrophages can modify steroidogenesis of Leydig cells. *Endocr J* 1996; **43**: 477–485.
- [31] ORRE M, ROGERS PAW. Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 1999; **73**: 47–50.
- [32] OTTO C, BAUER K. Dipeptide uptake: a novel marker for testicular and ovarian macrophages. *Anat Rec* 1996; **245**: 662–667.
- [33] PETROVSKA M, DIMITROV DG, MICHAEL SD. Quantitative changes in macrophage distribution in normal mouse ovary over the course of estrous cycle examined with an Image Analysis System. *Am J Reprod Immunol* 1996; **37**: 175–183.
- [34] POLLARD JW, LIN EY, ZHU L. Complexity in uterine macrophage responses to cytokines in mice. *Biol Reprod* 1998; **58**: 1469–1475.
- [35] PRABHALA RH, WIRA CR. Sex hormone and IL-6 regulation of antigen resresentation in the female reproductive tract. *J Immunol* 1995; **155**: 5566–5573.
- [36] ROITT IM. Essential Immunology. 1994 Oxford Blackwell Scientific Publications.
- [37] SILVERSTEIN AM. The most elegant immunological experiment of the XIX century. *Nature Immunol* 2000; **1**: 93–94.
- [38] SUENAGA Y, KATABUSHI H, FUKUMATSU Y, OKAMURA H. Distribution and cytological properties of macrophages in human fallopian tubes. *Acta Anat (Basel)* 1998; **163**: 10–19.
- [39] SUZUKI H, KANAGAWA H, NISHIMURA J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol Lett* 1996; **51**: 141–147.
- [40] SUZUKI T, SASANO H, TAKAYA R, FUKAYA T, YAJIMA A, DATE F, NAGURA H. Leukocytes in normal cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization. *Hum Reprod* 1998; **13**: 2186–2191.
- [41] TAKAYA R, FUKAYA T, SASANO H, SUZUKI T, TAMURA M, YAJIMA A. Macrophages in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Hum Reprod* 1997; **12**: 1058–1512.
- [42] TERLIKOWSKI S, SULKOWSKI S. Czynniki martwicy nowotworów alfa w komórkach żeńskiego układu rozrodczego. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 449–468
- [43] WANG YY, TAWFIK O, WOOD GW. Endotoxin-induced abortion in mice is mediated by activated fetal macrophages. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 40–50
- [44] WIRA CR, ROSSOLL RM, KAUSHIC C. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of estradiol on antigen presentation by vaginal cells. *Endocrinology* 2000; **141**: 2877–2885.
- [45] WOOD GW, HAUSMANN EH, KANAKARAJ K. Expression of chemokine genes in the mouse uterus during pregnancy. *Cytokine* 1999; **11**: 1038–1045.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 27.07.2001 r.

Przyjęto: 19.03.2002 r.

Adres autorów: 02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8

e-mail: wojciech@amaltea.sggw.waw.pl

niemialtowski@yahoo.com

niemialtow@alpha.sggw.waw.pl



## ANALIZA FRAKTALNA KSZTAŁTU KOMÓREK\*

### FRACTAL ANALYSIS OF CELLS SHAPE

Dariusz ORŁOWSKI, Zbigniew SOŁTYS

Zakład Neuroanatomii, Instytut Zoologii UJ, Kraków

*Streszczenie:* Kształt komórek tkanki nerwowej jest często bardzo skomplikowany, stąd wynika konieczność stosowania zaawansowanych metod matematycznych do jego opisu. Jedną z tych metod wywodzi się z geometrii fraktalnej. Prezentowany artykuł przedstawia podstawowe metody obliczania wymiaru fraktalnego komórek oraz przykłady jego zastosowania. Opisane zostały cztery metody obliczania wymiaru fraktalnego: metoda dylatacji, pudełkowa, cyrkla i pudełek z piaskiem. Mogą one zostać użyte w analizie złożoności przestrzennej komórek innych tkanek, a także naczyń krwionośnych, nowotworów i wielu innych struktur biologicznych. Uzupełnieniem wymiaru fraktalnego mogą być parametry, takie jak: rozmiar, masywność czy kołowość, które opisują odmienne cechy badanych obiektów. Łączne zastosowanie tych parametrów pozwala dokładniej opisać morfologię komórek.

*Słowa kluczowe:* analiza fraktalna, morfologia, glia, neurony.

*Summary:* Shape of the nervous tissue cells is often very complicated and to describe it we have to apply advanced methods of mathematical analysis. One of these methods derives from fractal geometry. This paper presents selected basic methods of calculation of the cell fractal dimension and examples of their application. Fractal dimension can be measured by pixel dilation, box counting, calliper and mass-radius methods. The methods can be used to measure the space-filling properties of various cell types, blood vessels, tumours etc. Additional parameters of the cell such as its solidity, convex hull area and form factor describe different shape features and are of important values complementary to fractal dimension. Simultaneous application of the parameters together with fractal dimension present characteristics of the cell morphology more complete.

*Key words:* fractal analysis, morphology, glia, neurones.

## 1. WSTĘP

Niewiele komórek ma równie skomplikowany kształt, jak te, które znajdujemy w tkance nerwowej. Ich morfologia wiąże się z pełnią przez nie funkcją. Stąd też istnieje konieczność znalezienia sposobu jej precyzyjnego opisu. Ilościowa analiza takiej struktury nie jest łatwa, zwłaszcza że w praktyce musimy zazwyczaj pracować z jej dwuwymiarowym obrazem mikroskopowym. Podstawowe parametry opisujące dwuwymiarowy obraz komórki, takie jak powierzchnia czy obwód, są często niewystarczające do opisu przestrzennej struktury tych komórek. Rozwiązaniem może być zastosowanie analizy fraktalnej umożliwiającej ilościowy opis morfologii nawet bardzo skomplikowanych obiektów [8, 14, 17, 19, 41]. W jej wyniku otrzymujemy współczynnik będący miarą komplikacji kształtu – wymiar fraktalny, zazwyczaj oznaczany przez  $D$  [37, 38].

Celem przedstawionego przeglądu jest omówienie metod analizy fraktalnej w badaniach morfologii komórek oraz jej najważniejszych osiągnięć. Nie wyczerpuje to oczywiście wszystkich możliwych zastosowań tej metody. W ostatnich latach analiza fraktalna oraz inne ilościowe metody morfologiczne zyskują wciąż wzrastającą popularność i wykorzystuje się je w wielu dziedzinach nauki. Oprócz wspomnianego wcześniej opisu pojedynczych komórek, badania te obejmować mogą również ich grupy, takie jak kolonie bakterii czy grzybów [29, 46]. Poza analizą kształtów możliwy jest również pomiar wymiaru fraktalnego powierzchni. Bada się w ten sposób tkanki lub kolonie komórek [3, 9, 36]. Parametr  $D$  powierzchni może mieć również znaczenie w diagnostyce tkanek zmienionych w wyniku kancerogenezy [15, 26, 30]. W przypadku zdjęć rentgenowskich lub obrazów uzyskanych przy pomocy MRI (obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego) analiza fraktalna umożliwi wychwycenie subtelnych zmian w przebiegu osteoporozy [11]. Obrazy pochodzące z mikroskopu elektronowego mogą posłużyć do zbadania zmian wymiaru fraktalnego struktur komórkowych, co wykorzystano między innymi w analizie zmian kształtu jądra komórkowego i heterochromatyny w komórkach nowotworowych, oraz wpływu na nie hormonów sterydowych [28, 34]. Metody fraktalne wykorzystać można również w analizie procesów genetyki i efektów leczenia nowotworów [49, 50, 51].

Wymiar fraktalny struktur pozakomórkowych, takich jak płytki starcze w mózgu, może mieć istotne znaczenie w diagnozowaniu choroby Alzheimera [33].

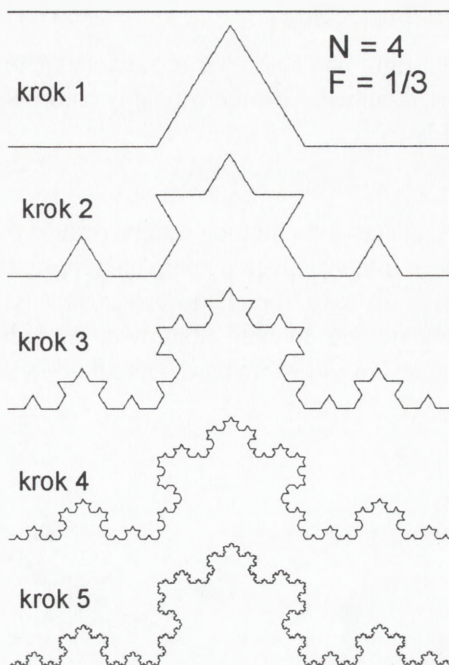
Za pomocą analizy fraktalnej Waliszewski wraz z współpracownikami badali zależności pomiędzy genotypem a fenotypem analizując tworzenie się i samoorganizację sieci komórkowych [49, 50, 51, 52]. Obrazy MRI posłużyć mogą do badania przepływu krwi w różnych narządach [22, 24, 47] oraz wiązania znakowanych substancji (na przykład neuroprzebiegów) do receptorów [25]. Analizować można również sygnały elektryczne powstające na synapsach oraz kinetykę kanałów jonowych [27, 45].

Omawiane metody znalazły także zastosowanie w analizie ruchów organizmów, czego przykładem stanowią badania stabilności postury człowieka przez opis zmian położenia punktu nacisku ciała na podłoże [5, 10].



## 2. FRAKTALE

Typowe figury i bryły geometryczne, takie jak linia, kwadrat czy sześciąt, można dokładnie opisać za pomocą geometrii euklidesowej, przedstawiając je odpowiednio w jednym, dwóch lub trzech wymiarach. Obiekty występujące w przyrodzie umykają jednak takiemu opisowi. Benoit Mandelbrot zauważył, że istnieją kształty możliwe do opisania jedynie za pomocą wymiaru ułamkowego (fraktalnego). Przykładem idealnego fraktala jest krzywa (zbiór) Kocha. Rycina 1 przedstawia kolejne etapy jej tworzenia. Widać, że składa się ona z coraz większej liczby powtórzonych krzywych z pierwszego kroku. Krzywą Kocha otrzymujemy po nieskończonej ilości powtórzeń. Jedną z jej cech jest samopodobieństwo – odpowiednio powiększony fragment podobny jest do całości.



RYCINA 1 Schemat konstrukcji krzywej Kocha

W przyrodzie można spotkać wiele obiektów przypominających abstrakcyjne obiekty fraktalne, na przykład kwiat kalafiora, drzewo oskrzelików płucnych, sieć naczyń krwionośnych, a także komórki układu nerwowego – neurony, astrocyty, mikroglej [ 8, 14, 17, 19, 32, 35, 41, 44]. Fragment kwiatu kalafiora czy sieci naczyń krwionośnych odpowiednio powiększony jest podobny do całości. Zaznaczyć należy, iż struktury te są fraktalami wyłącznie w sensie statystycznym. Od idealnych fraktali matematycznych różnią się tym, że cechy fraktalne wykazują tylko w pewnych przedziałach skali; ograniczenie to wynika z natury obiektów – nie są one tworzone w wyniku nieskończonej ilości iteracji i odpowiednio powiększone fragmenty przestają być podobne do całości. Niemniej jednak analiza fraktalna pozwala w sposób ilościowy opisać stopień komplikacji takich struktur.

Samopodobieństwo figur geometrycznych, takich jak krzywa Kocha, opisać można za pomocą równania wykładniczego [16, 21, 49, 53]:

$$N = F^D \quad (1)$$

gdzie  $N$  jest liczbą pomniejszonych  $F$  razy kopii, z których składa się fraktal w kolejnym kroku jego konstruowania (ryc. 1).

Korzystając z równania (1), wymiar fraktalny  $D$  definiuje się następująco [4, 8, 16, 20]:

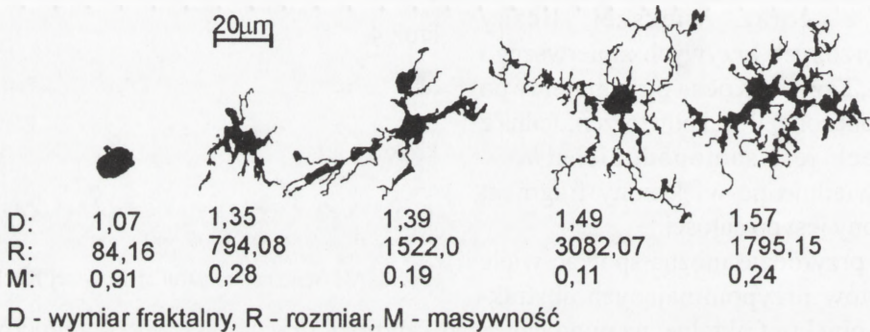
$$D = \log(N)/\log(F) \quad (2)$$

Dla figur na płaszczyźnie zawiera się on pomiędzy 1 a 2.

Przykładowo, wymiar fraktalny zbioru Kocha można policzyć korzystając ze wzoru (2)[13, 16]:

$$D = \log(4)/\log(3) = 1,26$$

Przedstawioną metodą można obliczyć wymiar fraktalny dobrze zdefiniowanych figur geometrycznych o znanych parametrach  $N$  i  $F$ , takich jak zbiór Kocha. Wymiar  $D$  obiektów naturalnych można uzyskać tylko w sposób przybliżony, stosując metody przedstawione poniżej. Stanowią one jednak dobre przybliżenie komplikacji przestrzennej komórki – im bardziej rozbudowana struktura wypustek, tym wyższa wartość  $D$  [1, 13, 35] (ryc. 2).

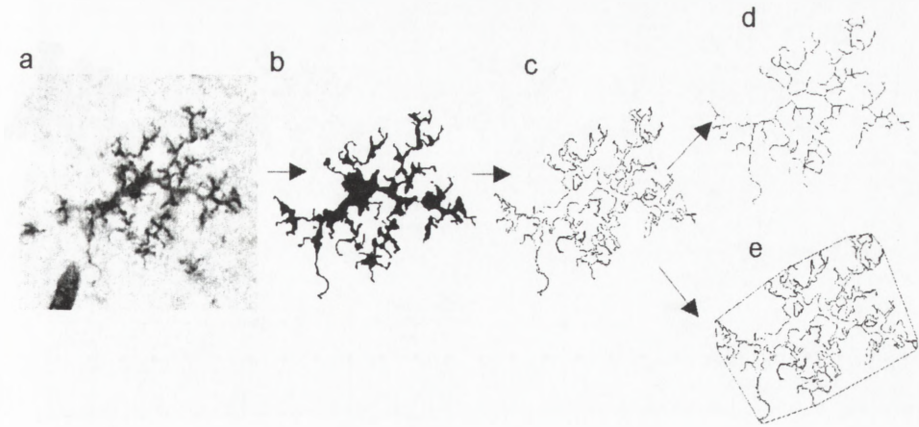


RYCINA 2. Sylwetki komórek mikrogleju wraz z podstawowymi parametrami opisującymi ich morfologię (wymiar fraktalny oraz masywność – jednostki bezwymiarowe; rozmiar [ $\mu\text{m}$ ])

### 3. METODY OBLICZANIA WYMIARU FRAKTALNEGO

Pierwszym etapem w analizie fraktalnej jest uzyskanie obrazu przedstawiającego sylwetkę komórki. Niekiedy proces ten może być wykonany automatycznie przez odpowiedni program do analizy obrazu [55]. Funkcja wykonująca tę czynność nosi nazwę binaryzacji (*thresholding*) (ryc. 3b). W innych przypadkach zachodzi konieczność ręcznego obrysowania sylwetek komórek. Jest to etap, którego dokładność może zaważyć na późniejszych wynikach. Powodzenie procedur automatycznych uzależnione jest od charakterystyki badanego obiektu, który powinien wyraźnie wyróżniać się z tła, co wiąże się między innymi z zastosowanymi technikami obróbki histologicznej.





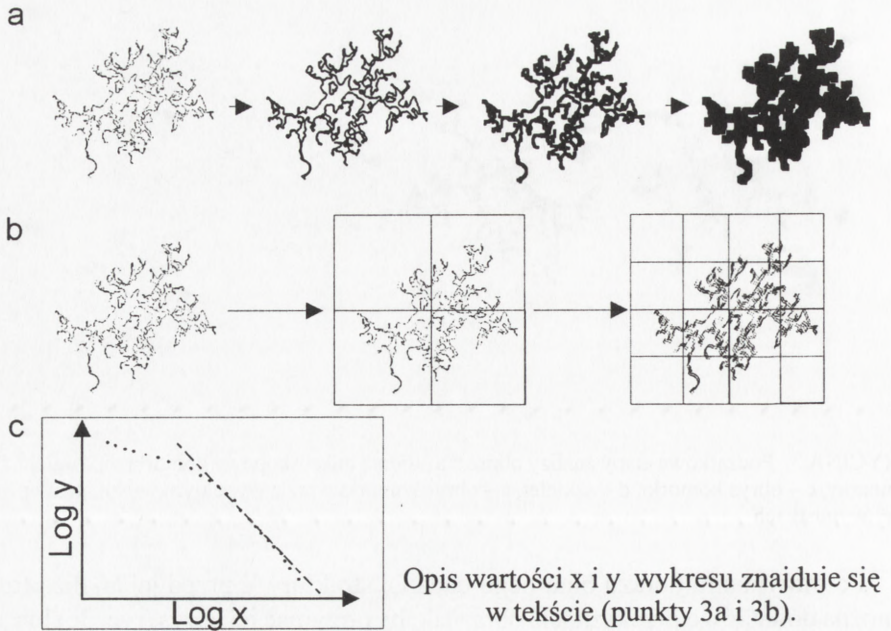
RYCINA 3. Początkowe etapy analizy obrazu: a – obraz mikroskopowy komórki mikrogleju, b – obraz binarny, c – obrys komórki, d – szkielet, e – obrys komórki wraz z wypukłym wielokątem opisanym na jej wypustkach

Po otrzymaniu obrazu binarnego badanej struktury, a przed jej analizą fraktalną, można dodatkowo przekształcić obraz tak, by otrzymać jej obrys (ryc. 3c) lub szkielet (ryc. 3d). W analizie fraktalnej komórki najpowszechniej wykorzystuje się obrysy, ponieważ odwzorowują one jej kształt, natomiast szkielet jest w znaczącym stopniu artefaktem, gdyż nie zawiera jej centralnych obszarów [19] i może dać zafalszowany wynik  $D$ . Obraz w postaci szkieletu wykorzystuje się w badaniach sieci naczyń krwionośnych lub charakterystyki rozgałęzień komórek [16].

- a) Jedną z najczęściej używanych metod wyznaczania wymiaru fraktalnego jest metoda dylatacji, która z powodzeniem była stosowana przez wielu badaczy [6, 13, 17, 30, 41, 43, 44]. Jest to technika łatwa do automatycznego przeprowadzenia – opierająca się na procedurach dostępnych w standardowych programach do analizy obrazu i dająca dobre wyniki. Polega ona na zastępowaniu każdego punktu obrysu kołami o rosnących średnicach, za każdym razem mierzone jest pole powierzchni powstałej figury (ryc. 4a). Powierzchnia figury podzielona przez średnice kół (ryc. 4c, wartość  $y$ ) wykreslana jest w skali logarytmiczno-logarytmicznej ( $\log\text{-}\log$ ), względem tej średnicy (ryc. 4c, wartość  $x$ ) [8, 13, 19, 42, 44]. Dla liniowego odcinka otrzymanej krzywej obliczany jest współczynnik nachylenia ( $S$ ), powiązany z wymiarem fraktalnym ( $D$ ) zależnością:

$$D = 1 - S \quad (3)$$

- b) Kolejną, często stosowaną metodą, jest metoda pudełkowa (*box counting*). Na powierzchnię badanego obszaru nakładane są kolejno siatki złożone z kwadratów o coraz mniejszej długości boku (ryc. 4b), w każdej siatce zliczana jest liczba kwadratów zawierających część badanej struktury (ryc. 4c, wartość  $y$ ). Tę liczbę przedstawia się na wykresie względem długości boku kwadratu (ryc. 4c wartość



RYCINA 4. Przebieg analizy fraktalnej: a – metoda dylatacji, b – metoda pudełkowa, c – wykres  $\log - \log$  (dla przedstawionej komórki mikrogleju). Dla metody dylatacji wartość  $y$  – powierzchnia powstałej figury podzielona przez średnicę elementów strukturalnych,  $x$  – średnica elementów strukturalnych; dla metody pudełkowej:  $y$  – liczba kwadratów zawierających fragment badanej struktury,  $x$  – długość boku kwadratu

$x$ ) w skali  $\log - \log$ . Wymiar fraktalny powiązany jest z nachyleniem linii regresji otrzymanej krzywej zależności (3) [4, 8, 13, 14, 19, 20, 39, 42].

- c) Inną metodą jest metoda „linijki” (*calliper*), w której obwód figury mierzony jest za pomocą coraz krótszej linijki, a wyniki przedstawiane są na wykresie  $\log - \log$ .
- d) Kolejna, to metoda „pudełek z piaskiem” (*mass-radius, sandbox*). Polega ona na tym, że na wybranych losowo punktach obrazu rysowane są okręgi o rosnących średnicach (lub kwadraty o rosnącej długości boku), następnie zliczane są wszystkie zawierające się w nich punkty obrysu [13, 19, 42]. Następnie, podobnie jak w poprzednich metodach określa się na wykresie  $\log - \log$  zależność między tą liczbą a średnicą kół (długością boku kwadratów).

Do testowania poszczególnych metod często używa się obiektów matematycznych o znanych  $D$ . Stąd wiadomo, że metoda dylatacji oraz pudełkowa nieco zaniżają wymiar fraktalny, a metoda „pudełek z piaskiem” daje trochę zawyżone wartości  $D$  [41].



## 4. PROBLEMY ANALIZY FRAKTALNEJ

Podstawowym problemem opisanych technik jest znalezienie jak najlepszego dopasowania krzywej regresji. Jak wspomniano wcześniej, opis fraktalny naturalnych obiektów możliwy jest tylko w pewnych granicach skali. Wynika z tego brak zależności liniowej na wykresie log-log. Niektórzy autorzy [13] dopasowywali linię regresji do całej otrzymanej krzywej, jednakże błąd dopasowania jest w tym przypadku bardzo duży. W części prac postuluje się wykonywanie obliczeń tylko dla jej liniowego odcinka. Poszukuje się takiego zakresu danych, który dla największej liczby punktów branych pod uwagę daje najmniejszy błąd dopasowania [13].

Kolejne błędy mogą wynikać z zastosowanych procedur obróbki obrazu. Jakość sprzętu mikroskopowego, rozdzielczość obrazu wykorzystanego w analizie oraz zastosowany program komputerowy może wpłynąć na otrzymane wyniki. Odmienne metody obliczania wymiaru fraktalnego również prowadzą do otrzymania różniących się wartości  $D$ . Wymusza to ostrożność w porównywaniu bezwzględnych wartości wymiaru fraktalnego otrzymanych w różnych eksperymentach. Ponadto analiza fraktalna jest niewrażliwa na pewne cechy morfologiczne (takie jak grubość i długość wypustek), stąd też wskazane jest obliczanie parametru  $D$  w połączeniu z innymi pomiarami stereologicznymi [41, 42].

## 5. ANALIZA FRAKTALNA KOMÓREK TKANKI NERWOWEJ

Podstawowym zastosowaniem analizy fraktalnej w naukach biologicznych są badania kształtu komórek o skomplikowanej morfologii, posiadających wypustki, takich jak neurony czy komórki glejowe. Wymiar fraktalny pozwala opisać zmiany zachodzące zarówno w czasie normalnego rozwoju [1, 2, 3, 7, 32, 35, 40, 42, 48], jak i w stanach patologicznych [43, 44]. Przykładem są badania komórek mikrogleju, które w trakcie rozwoju zmieniają swój kształt od form amebowatych do silnie rozgałęzionych [35]. W stanach patologicznych obserwujemy proces odwrotny – zmianę kształtu w kierunku form fagocytycznych [44]. Analiza fraktalna pozwala na uchwycenie zmian niedostępnych drogą subiektywnej klasyfikacji i opisanie ich w sposób ilościowy, ułatwiający późniejszą analizę wyników. Dzięki niej zauważono wzrost komplikacji kształtu mikrogleju, klasyfikowanych wcześniej do formy spoczynkowej [35] oraz subtelne różnice złożoności morfologicznej komórek między mózgiem zdrowym a uszkodzonym [44].

Analizę fraktalną wykorzystano w badaniach wpływu obecności astrocytów na rozwój neuronów [40] oraz oligodendrocytów [32] w kulturach komórkowych, a także rozwoju astrocytów oraz oligodendrocytów z ich wspólnej komórki prekursorowej (O2A) [1]. W tych przypadkach również stwierdzono występowanie subtelnych różnic złożoności kształtu komórek hodowanych w różnych środowiskach, które trudne byłoby

do zauważenia przy zastosowaniu klasycznych metod badań morfologicznych. Możliwy był również dokładny opis przebiegu zmian morfologii w czasie. Parametr D znalazł zastosowanie również w identyfikacji stadiów rozwojowych oligodendrocytów [2]. Wymiar fraktalny pozwala na ilościowy opis złożoności komórek nerwowych [14, 20], co ułatwia badanie zmian, takich jak: tworzenie, rozbudowa i zmiany komplikacji drzewka dendrytycznego podczas rozwoju, a także pod wpływem czynników zewnętrznych [6, 19, 23]. Próbuje się go również wykorzystać w klasyfikacji form tych komórek, większość badań w tym zakresie dotyczy klasyfikacji neuronów siatkówki [12, 18, 31, 54], które różnią się swoją złożonością przestrzenną. Przy użyciu wymiaru D możliwa jest również w pełni automatyczna klasyfikacja form komórkowych [7].

## 6. INNE PARAMETRY OPISUJĄCE KSZTAŁT KOMÓREK

Morfologię komórek można scharakteryzować za pomocą wielu innych parametrów, na których pomiar pozwala komputerowa analiza obrazu. Poza podstawowymi, takimi jak powierzchnia, obwód, długość, ilość wypustek, przydatne w analizie są również: rozmiar (zasięg wypustek), rozumiany jako pole wypukłego wielokąta opartego na wypustkach (*convex hull area*), oraz masywność, czyli stosunek pola komórki do pola tego wielokąta (*solidity*)(ryc.3e). Pierwszy z tych parametrów powiązany jest bezpośrednio z długością wypustek, drugi różnicuje komórki o odmiennej ich grubości.

Kolejnym, dość często stosowanym parametrem jest współczynnik kształtu (*form factor*), równy

$$4\pi \cdot \text{pole powierzchni/obwód}^2$$

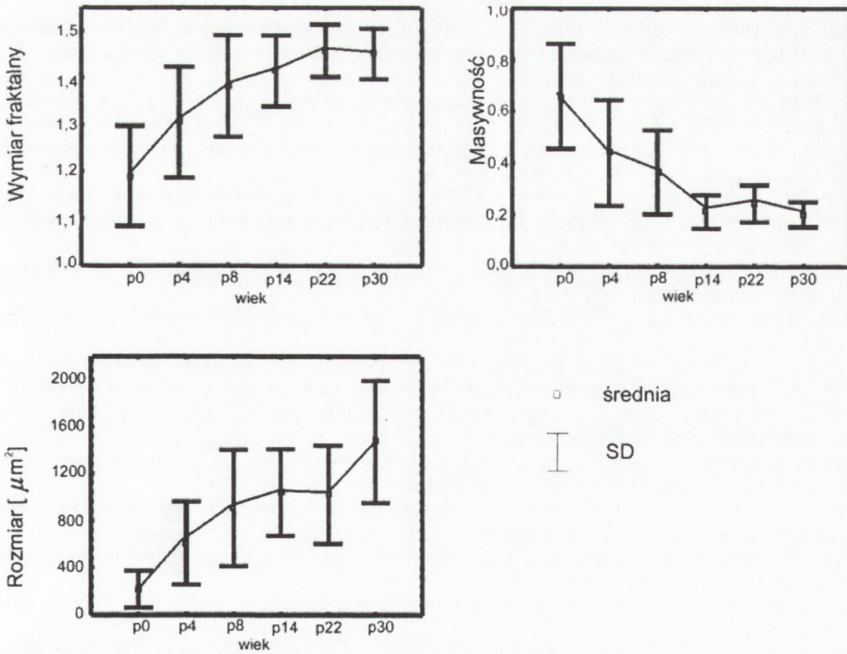
Dla idealnego koła jest on równy 1, a im bardziej nieregularny jest kształt, tym niższe są wartości tego parametru. Nadaje się on raczej do badania figur o kształtach nieznacznie odbiegających od kołistego np. komórek amebowatych [23].

Parametry te opisują różne aspekty geometrii badanego kształtu. Rycina 5 pokazuje przebieg zmian trzech wybranych parametrów opisujących komórki mikrogleju w rozwijającym się mózgu szczura. Jak widać, żaden z nich zastosowany osobno nie daje pełnego obrazu zmian tych komórek [Orłowski 2001, przygotowywane do publikacji]. Wymiar fraktalny rósł do 22. dnia życia, masywność malała do 14. dnia życia, a rozmiar zwiększał się przez cały okres objęty badaniami (ryc. 5).

## 7. PODSUMOWANIE

Analiza fraktalna, mimo swych niedoskonałości, w połączeniu z innymi pomiarami stereologicznymi, stanowi wygodne i obiektywne narzędzie służące do opisu kształtu komórek oraz ich zmian. Stosowanie obiektywnych narzędzi komputerowej analizy





RYCINA 5. Zmiany wymiaru fraktalnego, masywności i rozmiaru komórek mikrogleju w rozwijającym się mózgu szczura

obrazu ułatwia analizę danych oraz ich porównywanie, a ilościowe wyniki pozwalają na zastosowanie różnorodnych metod statystycznych. Biorąc to pod uwagę należy nadal pracować nad udoskonalaniem komputerowo wspomaganą analizę obrazu i jej praktycznych zastosowań w biologii i medycynie.

## LITERATURA

- [1] BEHAR TN. Analysis of fractal dimension of O2A glia cells differentiating *in vitro*. *Methods* 2001; **24**: 331–339.
- [2] BERNARD F, BOSSU J, GAILLARD S. Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *J Neurosci Res* 2001; **65**: 439–445
- [3] BIGERELLE M, IOST A. A new fractal method to calculate the fractal dimension of surfaces: application to human cell proliferation. *Comput Math Applic* 2001; **42**: 241–253.
- [4] BISOI AK, MISHRA J. On calculation of fractal dimension of images. *Patt Recogn Lett* 2001; **22**: 631–637.
- [5] BŁASZCZYK JW, KLONOWSKI W. Postural stability and fractal dynamics. *Acta Neurobiol Exp* 2001; **61**: 105–112.
- [6] BORODINSKY LN, FISZMAN ML. A single-cell model to study changes in neuronal fractal dimension. *Methods* 2001; **24**: 341–345.
- [7] COSTA LF, VELTE TJ. Automatic characterisation and classification of ganglion cells from the salamander retina. *J Comp Neurol* 1999; **404**: 33–51.
- [8] CROSS SS. Fractals in pathology. *J Pathol* 1997; **182**: 1–8.

- [9] DEPETRILLO PB, YANG Q, RACKOFF J, SANMIGUEL A, KARIMULLAH K. Surface fractal computation and its application to immunofluorescent histochemical studies of calpain and calpastatin in PC12 cells. *J Neurosci Methods* 2000; **103**: 191–197.
- [10] DUARTE M, ZATSIORSKY VM. On the fractal properties of natural human standing. *Neurosci Lett* 2000; **283**: 173–176.
- [11] FAULKNER KG, POCOCK N. Future methods in the assessment of bone mass and structure. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; **15**: 359–383.
- [12] FERNANDEZ E, ELDRED WD, AMMERMULLER J, BLOCK A, BLOH W, KOLB H. Complexity and scaling properties of amacrine, ganglion, horizontal and bipolar cells in the turtle retina. *J Comp Neurol* 1994; **347**: 397–408.
- [13] FERNANDEZ E, JELINEK HF. Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages, and potential problems. *Methods* 2001; **24**: 309–321.
- [14] FERNANDEZ E, BOLEA JA, ORTEGA G, LOUIS E. Are neurones multifractals? *J Neurosci Methods* 1999; **89**: 151–157.
- [15] HANDELS H, ROB TH, KREUSCH J, WOLFF HH, POPPL SJ. Computer-supported diagnosis of Melanoma in profilometry. *Meth Inform Med* 1999; **38**: 43–49.
- [16] HERMAN P, KOCSIS L, EKE A. Fractal branching pattern in the pial vasculature in the cat. *J Cerebral Blood Flow Metabol* 2001; **21**: 741–753.
- [17] HEYMANS O, FISSETTE J, VICO P, BLACHER S, MASSET D, BROUERS F. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? *Med Hypotheses* 2000; **54**: 360–366.
- [18] JELINEK HF, SPENCE I. Categorisation of physiologically and morphologically characterised non-a / non-b cat retinal ganglion cells using fractal geometry. *Fractals* 1997; **5**: 673–684.
- [19] JELINEK HF, FERNANDEZ E. Neurones and fractal: how reliable and useful are calculations of fractal dimensions? *J Neurosci Methods* 1998; **81**: 9–18.
- [20] JESTCZEMSKI F, SERNETZ M. Multifractal approach to inhomogeneous fractals. *Physica A* 1996; **225**: 275–282.
- [21] JONES CL, JELINEK HF. Wavelet packet fractal analysis of neuronal morphology. *Methods* 2001; **24**: 347–358.
- [22] KALLIOKOSKI KK, KUUSELA TA, NUUTILA P, TOLVANEN T, OIKONEN V, TERÄS M, TAKALA TES, KNUUTI J. Perfusion heterogeneity in human skeletal muscle: fractal analysis of PET data. *Eur J Nucl Med* 2001; **28**: 450–456.
- [23] KAWA A, STAHLHUT M, BEREZIN A, BOCK E, BEREZIN V. A simple procedure for morphometric analysis of processes and growth cones of neurones in culture using parameters derived from the contour and convex hull of the object. *J Neurosci Methods* 1998; **79**: 53–64.
- [24] KUIKKA JT, HARTIKAINEN P. Heterogeneity of cerebral blood flow: a fractal approach. *Nuklearmedizin* 2000; **39**: 37–42.
- [25] KUIKKA JT, REPO E, BERGSTROM KA, TUPALA E, TIIHONEN J. Specific binding and laterality of human extrastriatal dopamine D2/D3 receptors in late onset type 1 alcoholic patients. *Neurosci Lett* 2000; **292**: 57–59.
- [26] LANDINI G, RIPPIN JW. How important is tumour shape? Quantification of the epithelial-connective tissue interface in oral lesions using local connected fractal dimension analysis. *J Pathol* 1996; **179**: 210–217.
- [27] LIEBOVITCH LS, SCHEURLE D, RUSEK M, ZOCHOWSKI M. Fractal Methods to Analyse Ion Channel Kinetics. *Methods* 2001; **24**: 359–375.
- [28] LOSA GA, GRABER R, BAUMANN G, NONNENMACHER TF. Effects of steroid hormones on nuclear membrane and membrane-bound heterochromatin from breast cancer cells evaluated by fractal morphology. *Analit Quantitative Cytol Histol* 1999; **21**: 430–436.
- [29] LUNDY SD, PAYNE RJ, GILES KR, GARRILL A. Heavy metals have different effects on mycelial morphology of *Achlya bisexualis* as determined by fractal geometry. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **201**: 259–263.
- [30] MATTENFELDT T. Non-linear deterministic analysis of tissue texture: a stereological study on mastopathic and mammary cancer tissue using chaos theory. *J Microscop* 1997; **185**: 47–66.
- [31] MORIGIWA K, TAUCHI M, FUKUDA Y. Fractal analysis of ganglion cell dendritic branching patterns of the rat and cat retinae. *Neurosci Res Suppl* 1989; **10**: 131–140.
- [32] MORLEY M, PLEASURE D, KREIDER B. Quantification of the effects of the astrocytes on oligodendroglial morphology. *J Neurosci Res* 1997; **49**: 219–228.
- [33] NAKAYAMA H, KIATIPATTANASAKUL W, NAKAMURA S, MIYAWAKI K, KIKUTA F, UCHIDA K, KUROKI K, MAKIFUCHI T, YOSHIKAWA Y, DOI K. Fractal analysis of senile plaque observed in various animal species. *Neurosci Lett* 2001; **297**: 195–198.
- [34] NIELSEN B, ALBREGTSEN F, DANIELSEN HE. The use of fractal features from the periphery of cell nuclei as a classification tool. *Analit Cellular Pathol* 1999; **19**: 21–37.



- [35] ORŁOWSKI D, ZIAJA M, SOŁTYS Z, JANE CZKO K. Zmiany morfologii mikrogleju w rozwijającym się mózgu szczura. V Konferencja Neurochemiczna: Molekularne podstawy patologii i terapii schorzeń neurologicznych. Warszawa 14.12.2000.
- [36] RIGAUT JP, SCHOEVAERT-BROSSAULT D, DOWNS AM, LANDINI G. Asymptotic fractals in the context of grey-scale images. *J Microsc* 1998; **189**: 57–63.
- [37] RYBACZUK M, ZIELIŃSKI W. The concept of physical and fractal dimension I. The projective dimensions. *Chaos Solit Fract* 2001; **12**: 2517–2535.
- [38] RYBACZUK M, KĘDZIA A, ZIELIŃSKI W. The concept of physical and fractal dimension II. The differential calculus in dimensional spaces. *Chaos Solit Fract* 2001; **12**: 2537–2552.
- [39] SANDAU K, KURZ H. Measuring fractal dimension and complexity – an alternative approach with an application. *J Microsc* 1997; **186**: 164–176.
- [40] SCHAFFNER AE, GHESQUIERE A. The effect of type I astrocytes on neuronal complexity: a fractal analysis. *Methods* 2001; **24**: 323–329.
- [41] SMITH JR. TG, LANGE GD, MARKS WB. Fractal methods and results in cellular morphology-dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods* 1996; **69**: 123–136.
- [42] SMITH JR. TG, MARKS WB, LANGE GD, SHERIFF JR. WH, NEALE EA. A fractal analysis of cell images. *J Neurosci Methods* 1989; **27**: 173–180.
- [43] SOŁTYS Z, JANE CZKO K, ORZYŁOWSKA-ŚLIWIŃSKA O, ODERFELD-NOWAK B, ZAREMBA M, JANUSZEWSKI S, MOSSAKOWSKI MJ. Ilościowa morfologia komórek glejowych o wzmożonej ekspresji receptorów NGF w polu CA1 hipokampa szczura po niedokrwieniu mózgu. V Konferencja Neurochemiczna: Molekularne podstawy patologii i terapii schorzeń neurologicznych. Warszawa 14.12.2000.
- [44] SOŁTYS Z, ZIAJA M, PAWLIŃSKI R, SETKOWICZ Z, JANE CZKO K. Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *J Neurosci Res* 2001; **63**: 90–97.
- [45] TAKEDA T, SAKATA A, MATSUOKA T. Fractal dimension in the occurrence of miniature end-plate potential in a vertebrate neuromuscular junction. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 1999; **23**: 1157–1169.
- [46] TANG S, MA Y, SEBASTINE IM. The fractal nature of *Escherichia coli* biological flocs. *Colloids Surf B: Biointerf* 2001; **20**: 211–218.
- [47] TOURASSI GD, FREDERICK ED, VITTITOE NF, COLEMAN RE. Fractal texture analysis of perfusion lung scans. *Comput Biomed Res* 2000; **33**: 161–171.
- [48] VILELA MJ, MARTINS ML, BOSCHETTI SR. Fractal patterns for cells in culture. *J Pathol* 1995; **177**: 103–107.
- [49] WALISZEWSKI P, MOLSKI M, KONARSKI J. On the holistic approach in cellular and cancer biology: nonlinearity, complexity, and quasi-determinism of the dynamic cellular network. *J Surgical Oncol* 1998; **68**: 70–78.
- [50] WALISZEWSKI P, MOLSKI M, KONARSKI J. Self-similarity, collectivity, and evolution of fractal dynamics during retinoid-induced differentiation of cancer cell population. *Fractals* 1999; **7**: 139–149.
- [51] WALISZEWSKI P, KONARSKI J, MOLSKI M, On the modification of fractal self-space during cell differentiation or tumour progression. *Fractals* 2000; **8**: 195–203.
- [52] WALISZEWSKI P, MOLSKI M, KONARSKI J. On the relationship between fractal geometry of space and time in which a system interacting cells exists and dynamics of gene expression. *Acta Biochim Pol* 2001; **48**: 209–220.
- [53] WEST GB, BROWN JH, ENQUIST BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science* 1999; **284**: 1677–1679.
- [54] WINGATE RJT, FITZGIBBON T, THOMPSON ID. Lucifer yellow, retrograde tracers, and fractal analysis characterise adult ferret retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 1992; **323**: 449–474.
- [55] YANG X, BEYENAL H, HARKIN G, LEWANDOWSKI Z. Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Wat Res* 2001; **35**: 1149–1158.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 11.12.2001 r.

Przyjęto: 08.03.2002 r.

Adres autorów: Ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków

e-mail: orlowski@uj.edu.pl





## WPLYW CIŚNIENIA OSMOTYCZNEGO NA STAN FIZJOLOGICZNY KOMÓREK BAKTERYJNYCH

### INFLUENCE OF OSMOTIC PRESSURE ON PHYSIOLOGICAL CONDITION OF BACTERIAL CELLS

Szymon POWAŁOWSKI, Piotr GULEWICZ, Włodzimierz GRAJEK

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu

*Streszczenie:* W naturalnym środowisku bakterie często narażone są na warunki stresowe związane ze zmianami takich parametrów, jak: temperatura, pH czy ciśnienie osmotyczne. W związku z tym w toku ewolucji mikroorganizmy wykształciły mechanizmy pozwalające im aktywnie przeciwdziałać niekorzystnym czynnikom. Podczas stresu osmotycznego komórki akumulują wewnątrz specyficzne substancje osmoregulacyjne. Ich kontrolowane gromadzenie umożliwia komórkom bakteryjnym utrzymanie odpowiedniego poziomu turgoru, niezbędnego do ich właściwego funkcjonowania. Poza utrzymaniem turgoru, substancje osmoregulacyjne wpływają pozytywnie na stabilizację błon i struktury białek, nie zakłócając przy tym procesów biochemicznych zachodzących w komórce. Gromadzenie substancji osmoregulacyjnych odbywa się przez pobranie z pożywki i/lub syntezę. Do regulacji ich stężenia w cytoplazmie wykorzystywane są specjalne, osmotycznie indukowane mechanizmy transportowe oraz kanały uaktywniane przez bodźce mechaniczne.

*Słowa kluczowe:* osmoregulacja, substancje ochronne, betaina, prolina, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

*Summary:* Microorganisms are all the time exposed to highly stressful circumstances including osmotic stress, temperature, and pH changes. To survive under the unfavourable conditions microorganisms possess specific adaptation mechanisms. Under osmotic stress conditions, meant as a sudden decrease or increase of osmotic pressure, particularly important is to maintain turgor pressure at appropriate level. To keep intracellular osmolarity and turgor pressure balanced there is limited group of organic osmolytes – compatible solutes. Many microorganisms accumulate compatible solutes during periods of decreased water activity. The controlled amassing of these organic osmolytes allow the cells to control turgor pressure. Besides, compatible solutes have a positive influence on membrane stabilization and proteins structure. The osmolarity of the environment regulates intracellular concentration of compatible solutes. This involves changes in transport systems activities (uptake from environment) and/or synthesis.

*Key words:* osmoregulation, stress protectants, glycine betaine, proline, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

## WPROWADZENIE

Parametrem określającym oddziaływanie dwu roztworów oddzielonych półprzepuszczalną przegrodą (błoną) jest ciśnienie osmotyczne. Osmolalność, opisująca ciśnienie osmotyczne roztworu, wyrażana jest w osmolach, czyli molach substancji aktywnych znajdujących się w roztworze (wszystkich substancji łącznie) na kilogram rozpuszczalnika. W przeciwieństwie do ciśnienia osmotycznego osmolalność nie zależy od temperatury, natomiast na jej wartość, oprócz ilości osmotycznie aktywnych cząstek obecnych w roztworze, mają wpływ również ich kształt, rozmiar i ładunek. W praktyce osmolalność roztworów można określić przez pomiar takich właściwości roztworów, jak: punkt zamarzania, ciśnienie par i punkt wrzenia [8, 11, 39].

Innym parametrem związanym z zagadnieniem osmoregulacji jest ciśnienie turgoru. Jest to aktualne ciśnienie wywierane na warstwę peptydoglikanową, spowodowane różnicą potencjału chemicznego pomiędzy cytoplazmą a otoczeniem. Ciśnienie to jest regulowane przez kontrolę ilości zawartych w cytoplazmie specyficznych substancji osmoaktywnych [12, 23, 24]. Wszystkie żywe komórki, w tym także bakterie, odznaczają się dodatnim ciśnieniem turgoru. Jest ono niezbędne dla normalnego funkcjonowania i rozwoju komórki. Dokładna wartość turgoru jest trudna do zmierzenia, jakkolwiek różne źródła literaturowe podają, że waha się ona w zakresie 0,1–1,0 MPa (1–10 barów) dla bakterii gram-ujemnych i 1,5–2,5 MPa (15–25 barów) dla bakterii gram-dodatnich [8, 31, 39, 49]. Dzięki swej mocnej i stosunkowo elastycznej otoczce mureinowej komórki są w stanie znieść ciśnienia około dziesięć razy większe niż w standardowej oponie samochodowej [49]. Znacznie wyższe wartości ciśnienia turgoru, podawane dla bakterii gram-dodatnich, tłumaczone są koniecznością gromadzenia większej ilości rozpuszczalnika cytoplazmatycznego (wody), potrzebnego do rozwoju wielowarstwowej ściany peptydoglikanowej [8]. Sądzi się bowiem, iż to właśnie turgor dostarcza podstawowej siły mechanicznej niezbędnej do rozwoju ściany komórkowej [11, 49]. Jak już wspomniano, komórki utrzymują zawsze pewną nadwyżkę turgoru, to znaczy koncentracja substancji osmoaktywnych jest zawsze nieco wyższa niż w otoczeniu [31]. Obliczono, że minimalna ilość wolnej wody w cytoplazmie, niezbędna do wzrostu komórki bakteryjnej, wynosi około 0,5 cm<sup>3</sup>/g suchej masy komórki [18].

Bakterie aktywnie reagują na stres osmotyczny, który rozumiany jest jako zmiana ciśnienia osmotycznego w ich środowisku [12]. Reakcja ta jest zwykle nazywana osmoregulacją lub osmoadaptacją. Ma ona na celu utrzymanie turgoru i objętości komórki w normalnych, fizjologicznie określonych granicach. Z utrzymaniem turgoru wiąże się również pojęcie wrażliwości osmotycznej, rozumianej jako mechanizm odbierania, rejestracji i przetwarzania sygnałów powodowanych zmianami ciśnienia osmotycznego środowiska. Receptory komórkowe mogą rejestrować wiele sygnałów związanych z takimi parametrami, jak: ciśnienie hydrostatyczne, osmolalność, potencjał jonowy, koncentracja poszczególnych molekuł sygnałowych i inne [8]. Należy jednak zaznaczyć, iż mechanizmy te wciąż jeszcze należą do słabo poznanych.



Wzrost ciśnienia osmotycznego w pożywce powoduje powstanie gradientu, zgodnie z którym następuje wypływ wody z komórki. Może to prowadzić do spadku turgoru, plazmolizy i dehydratacji składników cytoplazmy [11]. Natomiast nagły spadek ciśnienia osmotycznego w środowisku komórki może prowadzić do nadmiernego pobrania wody, powodując jej puchnięcie, a w skrajnych wypadkach nawet rozerwanie [19]. Stwierdzono, iż komórki bakterii gram-dodatnich nie są tak podatne na plazmolizę, jak komórki bakterii gram-ujemnych. Prawdopodobnie jest to związane z silną adhezją błony cytoplazmatycznej do stosunkowo sztywnej mureinowej ściany komórkowej oraz znacznie wyższym ciśnieniem turgoru [39].

Nagła zmiana ciśnienia osmotycznego środowiska zmusza komórkę do natychmiastowej kompleksowej reakcji. Jak dotąd opisano dwa podstawowe mechanizmy adaptacyjne. Pierwszy z nich, występujący u ekstremalnie halofilnych bakterii, polega na wewnątrzkomórkowym gromadzeniu wysokich stężeń jonów nieorganicznych [19]. Drugi z mechanizmów, wykorzystywany przez bakterie żyjące w środowiskach cechujących się jedynie okresowym występowaniem stanów obniżonej aktywności wodnej, polega na gromadzeniu substancji osmoregulacyjnych [8]. Terminem tym określane są substancje akumulowane przez komórki w warunkach stresu osmotycznego, nie mające negatywnego wpływu na procesy życiowe zachodzące w komórkach [11].

Strategia polegająca na gromadzeniu tego typu substancji nie jest charakterystyczna wyłącznie dla bakterii, lecz również dla komórek eukariotycznych, w tym także roślin i zwierząt (również ssaków) [52, 31]. Utrzymanie stałej wartości potencjału osmotycznego wewnątrz komórki odbywa się w drodze kontroli stężenia składników osmoregulacyjnych w cytoplazmie. Uogólniając, zawartość składników osmoregulacyjnych w cytoplazmie jest w sposób bardzo precyzyjny regulowana przez zewnętrzne ciśnienie osmotyczne. W sytuacji, gdy zewnętrzne ciśnienie osmotyczne zaczyna rosnać, dla uzyskania stanu równowagi ilość tych składników jest uzupełniana, natomiast gdy ciśnienie to zaczyna spadać, ich nadmiar jest natychmiast usuwany, podczas gdy stężenie innych substancji (np. pozostałych aminokwasów i cukrów itp.) pozostaje bez zmian [39].

Stężenie substancji osmoregulacyjnych w cytoplazmie kształtuje gradient osmotyczny, oddziałujący przez ściany komórkowe i wpływający tym samym na ilość wody w komórce. Transport wody przez podwójną warstwę lipidową uważano długo za całkowicie pasywny proces dyfuzyjny. Jakkolwiek woda może przedostawać się pasywnie przez błony cytoplazmatyczne, decydującą rolę w jej transporcie odgrywają specjalne kanały wodne (ang. *aquaporins*). Początkowo kanały te odkryto u ssaków, jednak niedawno udowodniono ich istnienie również u bakterii. Zidentyfikowano nawet gen kodujący te kanały u *Escherichia coli*. Udało się również przy pomocy mikroskopu elektronowego zaobserwować strukturę i funkcjonowanie takiego kanału [39]. Należy jednak zaznaczyć, że zagadnienie to nie jest jeszcze do końca zbadane.

## SUBSTANCJE OSMOREGULACYJNE – CHARAKTERYSTYKA I WŁAŚCIWOŚCI

Głównym zadaniem substancji osmoregulacyjnych w komórce bakteryjnej jest regulacja ciśnienia osmotycznego i utrzymanie turgoru [21]. Jednakże nie wszystkie substancje osmoaktywne mogą pełnić rolę osmoregulacyjną. W wielu wypadkach trudno określić, dlaczego spośród substancji należących do tej samej grupy związków chemicznych (np. aminokwasów) jedne są wykorzystywane przez komórki w osmoregulacji, a inne nie [50–52]. Na podstawie wieloletnich badań ustalono jednak szereg cech, którymi odznaczają się substancje osmoregulacyjne:

- Są z reguły małymi, organicznymi cząsteczkami [25]. Wyjątek stanowią jony potasowe, które często również są zaliczane do substancji osmoregulacyjnych [23, 24]; najczęściej występują one jedynie w postaci soli kwasu glutaminowego (ich właściwości i rola w osmoregulacji nie jest całkowicie zgodna z ogólną definicją) [11, 12, 15].
- Są dobrze rozpuszczalne w wodzie i mogą być gromadzone w wysokich stężeniach (nawet do kilku moli) w cytoplazmie komórek, bez negatywnego wpływu na procesy życiowe [12].
- Są zwykle cząstkami amfoterycznymi lub obojętnymi, nie mającymi ładunku w szerokim zakresie pH. Dzięki temu ich pobranie nawet w znacznych ilościach nie wpływa na równowagę elektrolityczną i/lub kwasowo-zasadową w komórce [31].
- Potrafią w sposób selektywny i kontrolowany przenikać przez błony komórkowe, a ich poziom w cytoplazmie określany jest przez zewnętrzne ciśnienie osmotyczne [11, 20].
- Zgromadzone w wysokich stężeniach nie obniżają aktywności enzymów [38].
- Mogą stabilizować strukturę białek (zapobiegają denaturacji i wysalaniu) [21].
- Mogą stabilizować strukturę błon komórkowych, np. wchodząc w interakcje z polarnymi grupami fosfolipidów [2, 26].
- Nie zakłócają ważnych procesów biochemicznych, takich jak replikacja DNA [31].
- W większości nie stanowią produktów pośrednich w szlakach metabolicznych, lecz są ich produktami końcowymi [19].
- Dodatkowo niektóre spośród substancji osmoregulacyjnych mają właściwości ochronne w stosunku do składników cytoplazmy, stąd nazywane są często osmoochronnymi [11].

Do składników osmoregulacyjnych zaliczane są substancje należące do wielu grup związków organicznych. Różni badacze [18, 25, 31, 39, 50–52] zaliczają do tej grupy: aminokwasy, takie jak: alanina, glicyna, glutamina, prolina, tauryna oraz krótkie peptydy i ich pochodne (najczęściej *N*-zmetylowane i sulfonowe), jak np. karnityna, betaina (N,N,N-trimetyloglicyna), DMSP (dimetylosulfopropionian), ektoina (tetrahydro-pyrimidyna); cukry, takie jak: trehaloza, sacharoza, laktoza; alkohole wielo-wodrotlenowe, takie jak: glicerol, glukozyloglicerol, sorbitol, mannitol i inne.



## Potas

Jony potasu są kationami najpowszechniej występującymi w cytoplazmie bakterii. Ich rola jako substancji osmoaktywnych sprowadza się głównie do utrzymywania na odpowiednim poziomie turgoru. W normalnych warunkach osmolarności pożywki, w stacjonarnej fazie wzrostu komórek, utrzymywany jest ciągle pewien przepływ jonów potasu, polegający na tym, że ciągły ich wypływ jest kompensowany podobnym poziomem pobrania, co udało się stwierdzić w doświadczeniach z użyciem izotopów radioaktywnych. Strategia taka, polegająca na ciągłym utrzymywaniu w stanie częściowej aktywacji mechanizmów przepływu potasu, pozwala komórkom szybciej i efektywniej reagować na zmiany w ciśnieniu osmotycznym środowiska [11]. Udało się również dowiedzieć, że jony potasu, poza bezpośrednim wpływem na ciśnienie osmotyczne wewnątrz komórki, są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania innych mechanizmów związanych z osmoregulacją, jak np. synteza trehalozy u *Escherichia coli* [25].

## Glutamina i glutaminiany

U wielu bakterii gram-ujemnych jednymi z najważniejszych substancji osmoregulacyjnych są glutamina i kwas glutaminowy oraz jego sole – glutaminiany. Stężenie tych składników w cytoplazmie, w warunkach podwyższonej osmolarności, może wzrastać nawet dziesięciokrotnie, przekraczając tym samym poziom 90% całkowitej ilości wolnych aminokwasów zawartych w cytoplazmie. Poza tym kwas glutaminowy wykorzystywany jest jako źródło anionów (jako jon przeciwny do  $K^+$ ), biorących udział w bilansowaniu składu elektrolitycznego cytoplazmy [11].

## Betaina

Jedną z najważniejszych i najwcześniej opisywanych substancji osmoregulacyjnych jest betaina [18]. Jej ochronny wpływ potwierdzono między innymi dla takich rodzajów bakterii, jak: *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Vibrio*, *Pediococcus* i *Lactobacillus*. Potwierdzono, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, hodowane na pożywkach o podwyższonym ciśnieniu osmotycznym, znoszą wyższe stężenia soli, jeśli pożywka zawiera dodatek betainy. Również końcowe koncentracje komórek, osiągane w hodowlach o podwyższonym ciśnieniu osmotycznym, są wyższe, jeżeli do pożywki wprowadzono betainę [32]. Tylko niektóre drobnoustroje zaliczane do cyjanobakterii są zdolne do syntezy *de novo* tego związku – pozostałe zależą od jego pobierania ze środowiska. W tym celu są wykorzystywane między innymi, podobnie jak do pobierania proliny, systemy transportowe typu ProP i ProU (ang. *proline transport*, *proline uptake*) [11]. Większość bakterii nie ma systemów pozwalających im na syntezę betainy ze związków prostych. Jednakże wiele z nich, w tym *Escherichia coli*, jest zdolna w dwuetapowym procesie oksydacji przekształcać cholinę (poprzez formę aldehydową betainy) do betainy [4, 5]. Cholina jest przykładem prekursora substancji osmoregulacyjnej, który dopiero po pobraniu ze środowiska jest przekształcany

enzymatycznie w substancję aktywną [12, 23]. Do pobierania choliny wykorzystywane są systemy transportu napędzanego potencjałem protonowym [8, 11, 29, 38].

### Prolina

Stwierdzono, iż akumulowanie proliny przez bakterie może znosić inhibicję wzrostu powodowaną stresem osmotycznym. Gromadzenie tego składnika może zachodzić zarówno przez syntezę wewnątrz komórki, jak i przez pobranie z pożywki. Prowadzono doświadczenia, w których bakterie poddawano stresowi osmotycznemu w środowisku pozbawionym proliny, mimo to jej poziom w cytoplazmie komórek wzrastał. W badaniach prowadzonych na bakteriach *Bacillus subtilis*, umieszczonych w pożywce pozbawionej proliny, stwierdzono, że nagły wzrost ciśnienia osmotycznego (0,4 M NaCl) powoduje zmianę zawartości wewnątrzkomórkowej proliny, z początkowego poziomu 16 mM do około 500 mM [48]. Dowodzi to w sposób jednoznaczny, iż bakterie są zdolne do syntezy tego składnika, choć w warunkach dostępności proliny preferowanym mechanizmem jest jej pobranie ze środowiska. W tym celu wykorzystywane są takie mechanizmy, jak: ProP, ProU i PutP (omówione w dalszej części opracowania) [11].

### Trehaloza

Oprócz regulacji ciśnienia osmotycznego, trehaloza bierze udział w stabilizacji membran zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych [2, 8]. U wielu szczepów bakteryjnych, w tym również *E. coli*, jej gromadzenie odbywa się w wyniku syntezy [35]. Wewnątrzkomórkowy poziom trehalozy u tych bakterii może odpowiadać 20% ilości osmotycznie aktywnych składników zawartych w środowisku otaczającym komórki [11].

## WPLYW SUBSTANCJI OSMOREGULACYJNYCH NA ROZWÓJ BAKTERII

Mechanizmy pobierania oraz rodzaj związku pełniącego funkcję substancji osmoregulacyjnej zależą od rodzaju drobnoustrojów. Również wpływ poszczególnych substancji na stymulację tempa wzrostu drobnoustrojów jest zdecydowanie różny. Wydaje się, iż pewne mechanizmy pobierania lub syntezy mogą być charakterystyczne dla bardzo wąskich grup drobnoustrojów, jednakże dają się także zauważyć pewne podobieństwa oraz preferencje co do rodzaju akumulowanych substancji w obrębie grup bakterii gram-dodatnich oraz gram-ujemnych. Zauważono na przykład, że bakterie gram-ujemne reagują na nagły wzrost ciśnienia osmotycznego, gromadząc duże ilości glutaminianu wraz z jonami potasu, podczas gdy bakterie gram-dodatnie gromadzą aminokwasy, na przykład prolinę. Jednakże już w normalnych, nie stresowych



warunkach, bakterie gram-dodatnie zawierają duże, znacznie większe niż bakterie gram-ujemne, ilości jonów potasu oraz wolnych aminokwasów, ze znacznym udziałem kwasu glutaminowego, co jest związane między innymi z utrzymywaniem przez ich komórki wyższym ciśnieniem turgoru [21]. Odnosząc się do mechanizmów gromadzenia takich substancji, jak prolina i betaina, można stwierdzić, iż, poza pewnymi wyjątkami, bakterie gram-dodatnie mogą te substancje syntetyzować, z kolei drobnoustroje gram-ujemne pobierają je zwykle ze środowiska [39]. Być może jest to jedną z przyczyn odmiennego oddziaływania betainy na różne grupy drobnoustrojów. Stwierdzono bowiem, że składnik ten może stymulować wzrost bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* zarówno w warunkach stresu wywołanego jonami (KCl, NaCl), jak i innymi substancjami (sacharoza), podczas gdy stymulacyjny efekt betainy wobec bakterii fermentacji mlekowej (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*) obserwowano jedynie w warunkach stresu wywołanego działaniem soli. Różna jest też efektywność działania substancji osmoochronnych w odniesieniu do poszczególnych bakterii. Przykładowo ektoina w odniesieniu do bakterii z rodzajów *Escherichia* i *Erwinia* działa równie efektywnie jak betaina, podczas gdy jej działanie osmoochronne w stosunku do *Bacillus subtilis* jest zdecydowanie słabsze [27].

Stwierdzono również, że bakterie termofilne preferują jako substancje osmoregulacyjne cząstki o ładunku ujemnym, jak glutaminian czy 1,3,4,6-tetrakarboksyloheksan. Istnieją spekulacje, iż ujemnie naładowane cząstki mogą odgrywać również rolę w termostabilizacji. Przeciwnie, mezofile zdają się preferować cząstki elektrycznie neutralne, jak np. betaina. Może ona stabilizować białka i to nawet w stężeniach dochodzących do 3 moli. W badaniach eksperymentalnych stwierdzono również, że wywiera ona stabilizujący wpływ na błony oraz na aktywność enzymów [33].

Stabilizacyjne działanie substancji osmoregulacyjnych na białka było już kilkakrotnie potwierdzone, jednak mechanizm tego procesu nie jest jeszcze w pełni poznany. Prawdopodobny model ochrony przed denaturującym działaniem wysokich stężeń jonów nieorganicznych zakłada, że w cytoplazmie związki osmoregulacyjne utrzymują się w pewnej odległości od cząsteczek białek, w wyniku czego dochodzi do preferencyjnej hydratacji powierzchni białek. Takie rozmieszczenie wody prowadzi do sytuacji, w której rozerwanie struktury wodnej płaszcza otaczającego białka przez miejscowe lub całkowite rozwinięcie łańcucha polipeptydowego byłoby energetycznie niekorzystne. Prawdopodobnie dlatego pierwotna struktura białka pozostaje stabilna [18, 31].

Dowiedziano też, że niektóre substancje osmoregulacyjne mogą chronić bakterie również przed stresami innymi niż dehydratacja. Stwierdzono, że w wyniku akumulacji betainy wzrasta tolerancja na niską temperaturę u *Listeria monocytogenes*. Co więcej, warunki podwyższonej osmolalności wzmagają również tolerancję zarówno na niskie, jak i wysokie temperatury u większości bakterii [33]. Bakterie z rodzaju *Propionibacterium*, rosnące na pożywkach o wysokiej osmolalności, szybciej osiągają maksymalne tempo wzrostu, jeżeli do podłoża wprowadzono betainę. Wykazano również, że bakterie te nie są zdolne do wykorzystania betainy jako źródła węgla bądź azotu [34]. W innych badaniach prowadzonych również nad bakteriami propionowymi,

stwierdzono akumulację trehalozy w odpowiedzi na warunki stresowe. Oprócz podwyższonej osmolalności także nagły spadek temperatury wzmaga biosyntezę tej substancji [6]. Dowiedziono również, że warunki podwyższonej osmolalności mogą stymulować termotolerancję bakterii z rodzaju *Salmonella*. W hodowlach bakterii *Salmonella* na podłożach o podwyższonej osmolalności (0,2 M NaCl) stwierdzono pięciokrotnie wyższą syntezę trehalozy u pałeczek *Salmonella* hodowanych w temperaturze 45°C niż w próbie kontrolnej, którą stanowiła hodowla prowadzona w temperaturze 30°C. Wprowadzenie do podłoża substancji osmoochronnych, takich jak betaina, obniżało termooporność tych bakterii [9, 16, 17].

## PRZEPLÝW SUBSTANCJI OSMOREGULACYJNYCH I KONTROLA PROCESÓW OSMOADAPTACYJNYCH

Wzrost ciśnienia osmotycznego środowiska, prowadzący w efekcie do akumulacji substancji osmoregulacyjnych, nazywany jest stresem hiperosmotycznym, natomiast spadek ciśnienia osmotycznego prowadzący do usuwania składników osmo-regulacyjnych z komórki – stresem hipoosmotycznym.

Jak już wcześniej wspomniano, w warunkach zmieniającego się ciśnienia osmotycznego środowiska komórki mogą zarówno pobierać, jak i pozbywać się substancji osmoregulacyjnych. Do tego celu komórki wykorzystują pewne mechanizmy, zupełnie inne od mechanizmów służących do pobierania często tych samych związków chemicznych, mających dalej służyć jako źródło węgla lub azotu. Cechą charakterystyczną systemów służących do pobierania substancji osmoregulacyjnych, w przeciwieństwie do systemów pobierania substratów metabolizmu, jest ich wysokie powinowactwo w stosunku do swych podstawowych substratów. Cechują się one ponadto tym, że pozwalają osiągać w cytoplazmie stężenie substancji osmo-regulacyjnych rzędu kilku moli, oraz tym że w warunkach wysokiej osmolalności środowiska funkcjonują lepiej od zwykłych transporterów składników odżywczych [8]. Wskazuje się także na możliwość istnienia specyficznej autoinhibicji systemów pobierania substancji osmoregulacyjnych, działającej na zasadzie sprzężenia zwrotnego, wywoływanego nagromadzeniem substratu [46].

Stosunkowo dobrze poznano jedynie mechanizmy adaptacyjne wykorzystywane przez bakterie *Bacillus subtilis* oraz *Escherichia coli* [23, 24].

W wielu przypadkach wstępną, przejściową fazą reakcji na stres hiperosmotyczny jest akumulacja jonów potasu [21, 35]. Ma ona na celu szybkie wyrównanie ciśnienia wewnątrz komórki i tym samym utrzymanie turgoru, podczas gdy aktywowane są mechanizmy pobierania lub syntezy innych substancji osmoregulacyjnych [13]. W miarę jak zaczynają one funkcjonować, jony potasowe stopniowo są usuwane z komórki, a ich rolę w regulacji ciśnienia osmotycznego przejmują inne, organiczne substancje osmoregulacyjne, jak prolina, betaina bądź trehaloza [39]. Dzieje się tak, ponieważ



potas jako substancja nieorganiczna w stężeniach 0,7–0,8 M zaczyna już działać niekorzystnie na strukturę białek [25]. Poza tym pobranie dużej ilości potasu wiąże się z zachwianiem równowagi elektrolitycznej. Jednym ze sposobów jej utrzymania jest zwiększenie zawartości w cytoplazmie kwasu glutaminowego. Składnik ten przez niektóre bakterie, w tym *Escherichia coli*, może być syntetyzowany *de novo* [39]. Jednakże kwas glutaminowy, ze względu na posiadanie ładunku, nie spełnia wszystkich warunków wcześniej podanej definicji. Dlatego jego akumulacja, podobnie jak jonów potasu, odgrywa rolę raczej w początkowej fazie adaptacji, a jego poziom w cytoplazmie nie osiąga stężeń tak wysokich, jak ma to miejsce w wypadku innych substancji osmoregulacyjnych [12].

Osmotycznie kontrolowane procesy pobierania substancji osmoregulacyjnych regulowane są na poziomie genetycznym (indukcja ekspresji genów) i enzymatycznym (aktywacja białek transportowych). Stopień pobudzenia tych mechanizmów zależy od sygnału przekazywanego przez specjalne receptory zlokalizowane w błonach, rejestrujące zmiany w potencjale osmotycznym środowiska [23, 35].

Dobrze poznanym białkiem błonowym, odpowiedzialnym za rejestrację sygnałów osmotycznych, jest kinaza KdpD z *Escherichia coli*, biorąca udział w regulacji transkrypcji operonu *kdpFABC* (operon kodujący białka systemu transportowego należącego do rodziny ABC – *ATP-binding cassette*) [7]. Operon ten, występujący u *Escherichia coli*, koduje białka systemu Kdp, odpowiedzialnego za pobieranie jonów potasu. System ten odznacza się dużą wydajnością i powinowactwem do substratu, które to cechy umożliwiają mu skuteczne funkcjonowanie w warunkach niskich stężeń jonów  $K^+$  w pożywce, nawet poniżej 2 mM  $K^+$  [1, 8, 11, 12, 37]. Sygnałem wywołującym aktywację systemu jest rozciągnięcie lub naprężenie błony w następstwie nagłej zmiany ciśnienia osmotycznego, które prowadzą do autofosforylacji KdpD (białko pełniące funkcję receptorową). Grupa fosforanowa jest następnie przenoszona na regulator (KdpE), który wchodząc w interakcję z regionem promotorowym operonu *kdpFABC*, inicjuje jego transkrypcję. W związku z tym KdpE jest uznawany za specyficzny czynnik transkrypcyjny [15, 39]. Opisany proces, aktywowany po nagłym wzroście ciśnienia osmotycznego, jest co prawda natychmiastowy, jednak jedynie przejściowy. Określa się, iż ekspresja genów systemu Kdp powraca do poziomu podstawowego po około 30 minutach od wzbudzenia wywołanego szokiem [11].

Poza systemem Kdp, *Escherichia coli* ma jeszcze inne systemy pobierania potasu, takie jak Trk i Kup (ang. *transport system for  $K^+$  and  $K^+$  uptake*). Są to jednak konstytutywne systemy transportu i nie odgrywają one znaczącej roli w adaptacji do warunków stresu hiperosmotycznego [37]. Stwierdzono również, że systemy, które mogą być uznawane za homologii Kdp, występują także u wielu innych bakterii [12].

Systemem transportowym odpowiedzialnym za pobieranie betainy i proliny u *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* jest ProU (system transportu aktywnego, wykorzystujący energię ATP). Odznacza się on niskim powinowactwem substratowym w stosunku do proliny i wysokim w stosunku do betainy [11]. W przeciwieństwie do regulacji operonu *kdp*, transkrypcja operonu *proU* regulowana jest przez czynniki

niespecyficzne. Indukcja operonu *proU*, wywołana warunkami wzrastającego zasolenia, wymaga fazy adaptacyjnej, trwającej przeciętnie 15–20 minut [11, 13]. Prawdopodobnie za indukcję tego operonu, przynajmniej częściowo, odpowiedzialny jest też glutaminian potasu. Jego obecność wzmacnia transkrypcję oraz selektywność czynników trans-krypcyjnych w stosunku do promotorów [14].

Funkcję podobną do *proU* ma operon *proP*. W przeciwieństwie do *proU* jego ekspresja ma większe znaczenie podczas stacjonarnej fazy wzrostu. Maksymalny poziom indukcji *proP* jest w przybliżeniu 15-krotny, natomiast *proU* może być indukowany ponad 500-krotnie [11, 13, 23]. Mikroorganizmy z rodziny *Enterobacteriaceae*, takie jak *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*, mają jeszcze system transportowy PutP (ang. *proline permease*). W odróżnieniu do ProU i ProP służy on do transportu proliny, wykorzystywanej dalej w metabolizmie jako źródło węgla lub azotu [11]. Systemy transportowe typu ProP i ProU występują u wielu szczepów bakterii, u których optymalne stężenia substancji osmogennych w otoczeniu, wymagane do ich aktywacji, są różne. Na przykład optymalne stężenie NaCl wywołujące aktywację u *Escherichia coli* wynosi około 0,2 M [36], natomiast dla *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* 0,7–0,8 M, a dla *Lactobacillus plantarum* – 1,2 M [21].

W wypadku *Bacillus subtilis* dokładnie opisano trzy systemy transportowe biorące udział w pobraniu czwartorzędowych amin i ich pochodnych: OpuA, OpuC, OpuD (ang. *osmoprotectant uptake*) [28].

Aktywność OpuC i OpuD jest indukowana przez stres osmotyczny, natomiast OpuA jest systemem semi-konstytutywnym, to znaczy funkcjonującym również w normalnych warunkach, przy braku czynników stresowych, i to właśnie on, ze względu na dużą wydajność, ma największy udział w akumulacji betainy [22]. W pobieraniu betainy bierze również udział OpuD, który jest wysoce specyficznym systemem transportowym dla betainy, napędzanym potencjałem jonowym [8, 40]. Z kolei cechą wspólną OpuA i OpuD jest ich ograniczona specyficzność substratowa ukierunkowana na betainę, podczas gdy OpuC odznacza się wysoką wydajnością transportową w stosunku do wielu substancji osmoregulacyjnych [8]. W skład systemów OpuA i OpuC wchodzi białka wiążące ATP (OpuAA i OpuCA), białka błonowe (OpuAB i OpuCB) i powierzchniowe białka wiążące substrat (OpuAC i OpuCC). Wszystkie trzy systemy wykazują podobne powinowactwo do betainy, w zakresie  $K_m = 2\text{--}13 \mu\text{M}$ , jednak ich wydajność transportowa różni się znacząco, jak pokazano niżej:

$$[V_{\max} = 60\text{--}280 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} (\text{mg białka})^{-1}] [30].$$

*Bacillus subtilis* ma jeszcze dwa scharakteryzowane systemy transportowe: OpuB i OpuE. OpuE jest systemem podobnym do OpuD, z tym że wykorzystywany jest do transportu proliny [47]. Natomiast OpuB, choć blisko związany z OpuC, służy jedynie do transportu choliny i wraz z represorem (GbsR), reagującym na obecność choliny w pożywce, daje początek przemianom na szlaku biosyntezy betainy [29].



Jak już wcześniej wspomniano, niektóre składniki mogą być akumulowane przez komórki nie tylko przez pobranie z pożywki, lecz również przez syntezę. Do takich składników należy na przykład dwucukier trehaloza. Organizmami zdolnymi ją syntetyzować są *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* [35]. Operon *otsAB* koduje dwa enzymy: syntazę trehalozo-6-fosforanową (OtsA), katalizującą kondensację glukozy-6-fosforanu i glukozy-6-fosforanu oraz fosfatazę trehalozo-6-fosforanową (OtsB), katalizującą defosforylację kompleksu przejściowego do wolnej trehalozy [12]. Poza tym *Escherichia coli* nie może w ogóle korzystać z pozakomórkowych źródeł trehalozy, gdyż dwucukier ten jest podczas wchłaniania hydrolizowany w przestrzeni peryplazmatycznej, przez trehalazę (TreA), do dwóch cząsteczek glukozy i dopiero w takiej postaci transportowany do cytoplazmy (system transportowy PTS) (ang. *phosphotransferase carbohydrate uptake system*) [8, 18].

Niekiedy reakcja fizjologiczna na stres osmotyczny bywa trudna do wykrycia, gdyż znane są przykłady, kiedy substancje osmoregulacyjne były w dużych ilościach gromadzone już wcześniej, jak gdyby „na zapas”, jeszcze przed wystąpieniem warunków stresowych [46]. Postępowanie takie może być niekorzystne dla komórek bakteryjnych w wypadku, gdy ciśnienie osmotyczne środowiska nie wzrośnie, lecz zacznie spadać. Wówczas, w warunkach stresu hipoosmotycznego, aktywowane są mechanizmy wypływu substancji osmoregulacyjnych. Zjawisko to było obserwowane w wielu szczepach drobnoustrojów, które pozbywały się charakterystycznych dla siebie substancji osmoregulacyjnych [21, 46]. Zauważono na przykład, że komórki *Escherichia coli*, rosnące w warunkach podwyższonej osmolalności pożywki, potrafiły w odpowiedzi na szok hipoosmotyczny pozbyć się zapasu betainy w czasie krótszym niż 200 ms [8]. Najczęściej jednak w pierwszej kolejności komórki pozbywają się małych cząstek, jak np. jony potasu [12]. Stwierdzono, że u *Listeria monocytogenes*, poddanej działaniu obniżonego ciśnienia osmotycznego, wpływ betainy i L-karnityny trwał około 5 sekund [46].

W wypływie substancji osmoregulacyjnych uczestniczą prawdopodobnie opisane niedawno kanały uaktywniane przez bodźce mechaniczne (ang. *mechanosensitive channels* – skrót Msc) [43, 44]. Wpływ taki jest szybki, niezależny od energii metabolicznej, i może być blokowany niespecyficznie przez jony gadolinowe ( $Gd^{3+}$ ) [22]. Najlepiej dotąd poznanym kanałem tego typu jest kanał formowany przez białko MscL, występujący u *Escherichia coli*. Białko MscL jest zbudowane ze 136 aminokwasów i jego przypuszczalna masa wynosi 15 kDa [12, 42, 45]. Ma ono dwa centra aktywne, przy czym w jednym z nich grupą aktywną jest grupa karboksylowa, a w drugim aminowa [43]. Do otwarcia kanału dochodzi pod wpływem naprężenia lub naciągnięcia błony, spowodowanego zwiększeniem objętości komórki, będącego następstwem pobrania wody [41]. Na czułość aktywacji kanału wpływa potencjał błony, natomiast szczelina powstająca po otwarciu kanału wynosi w przybliżeniu 4 nm [3, 43]. Decydującą rolę w pozbywaniu się substancji osmoregulacyjnych w warunkach hipoosmotycznych odgrywają kanały uaktywniane przez bodźce mechaniczne, chociaż komórki wykorzystują do usuwania tych substancji również systemy transportu opartego na przenośnikach [22, 39].

## PODSUMOWANIE

Przeżycie bakterii w warunkach podwyższonego, jak i obniżonego ciśnienia osmotycznego uwarunkowane jest wieloma czynnikami. Jednym z najważniejszych mechanizmów adaptacyjnych jest kontrolowane gromadzenie substancji osmoregulacyjnych. Badania prowadzone w ostatnich latach znacznie poprawiły rozumienie funkcjonowania mechanizmów związanych z osmoregulacją. W przyszłości wykorzystanie tej wiedzy z pewnością pozwoli na lepszą kontrolę procesów, w których istotna jest przeżywalność bakterii.

## LITERATURA

- [1] ALTENDORF K, EPSTEIN W. The Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. [w] Lee AG [red.] Biomembranes. Greenwich, Conn. JAI Press 1996; 5: 403–420.
- [2] BENEY L, GERVAIS P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 57: 34–42.
- [3] BLOUNT P, SUKHAREV SI, MOE PC, SCHROEDER MJ, GUY HR, KUNG C. Membrane topology and multimeric structure of mechanosensitive channel protein of *Escherichia coli*. *EMBO J* 1996; 15: 4798–4805.
- [4] BOCH J, KEMPF B, BREMER E. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* 1994; 176: 5364–5371.
- [5] BOCH J, KEMPF B, SCHMID R, BREMER E. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterisation of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* 1996; 178: 5121–5129.
- [6] BOYAVAL P, DEBORDE C, CORRE C, BLANCO C, BEGUE E. Stress and osmoprotection in propionibacteria. *Lait* 1999; 79: 59–69.
- [7] BRANDON L, DOROUS S, EPSTEIN W, ALTENDORF K, JUNG K. Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2000; 38: 1086–1092.
- [8] BREMER E, KRÄMER R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. [w] Storz G, Hengge-Aronis [red.] Bacterial Stress Responses. Washington, D.C.: ASM Press, Chapter 6, 2000: 79–97.
- [9] CANOVAS D, FLETCHER SA, HAYASHI M, CSONKA LN. Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar. *typhimurium*. *J Bacteriol* 2001; 183: 3365–3371.
- [10] CARVALHEIRO F, ROSEIRO JC, GIRIO FM. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 1999; 16: 543–550.
- [11] CSONKA LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* 1989; 53: 121–147.
- [12] CSONKA LN, EPSTEIN W. Osmoregulation. [w] Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznokoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE [red.] *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Washington, D.C.: ASM Press 1996: 1210–1223.
- [13] CSONKA LN, HANSON AD. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 569–606.
- [14] CSONKA LN, IKEDA TP, FLETCHER SA, KUSTU S. The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolarity but not induction of the *proU* operon. *J Bacteriol* 1994; 176: 6324–6333.
- [15] EPSTEIN W. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 1986; 39: 73–78.
- [16] FLETCHER SA, CSONKA LN. Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Food Microbiol* 1998; 15: 307–317.



- [17] FLETCHER SA, RHODES D, CSONKA LN. Analysis of the effects of osmoprotectants on the high osmolality-dependent induction of increased thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Food Microbiol* 2001; **18**: 345–354.
- [18] GALINSKI EA. Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microbial Physiol* 1995; **37**: 273–328.
- [19] GALINSKI EA, TRÜPER H. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 1994; **15**: 95–108.
- [20] GARAY-ARROYO A, COVARRUBIAS A. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1999; **15**: 879–892.
- [21] GLAASKER E, KONINGS WN, POOLMAN B. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 575–582.
- [22] GLAASKER E, KONINGS WN, POOLMAN B. Glycine-betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypoosmotic shock. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10060–10065.
- [23] GLAASKER E. Osmotic regulation of transport processes in *Lactobacillus plantarum*, chapter 1 – General Introduction: 1–18 (in press).
- [24] GLAASKER E, TJAN FSB, TER STEEG PF, KONINGS WN, POOLMAN B. The physiological response of *Lactobacillus plantarum* towards salt and non-electrolyte stress. *J Bacteriol* 1998; **180**: 411–428.
- [25] GUTIERREZ C, ABE E, BOOTH IR. Physiology of osmotic stress response in microorganisms. *Int J Food Microbiol* 1995; **28**: 233–244.
- [26] HALVERSON LJ, FIRESTONE MK. Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 2414–2421.
- [27] JEBBAR M, VON BLOHN C, BREMER E. Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *FEMS Microbiol Lett* 1997; **154**: 325–330.
- [28] KAPPES RM, KEMPF B, BREMER E. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterisation of OpuD. *J Bacteriol* 1996; **178**: 5071–5079.
- [29] KAPPES RM, KEMPF B, KNEIP S, BOCH J, GADE J, MEIER-WAGNER J, BREMER E. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 1999; **32**: 203–216.
- [30] KEMPF B, BREMER E. OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 16701–16713.
- [31] KEMPF B, BREMER E. Uptake and synthesis of solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* 1998; **170**: 319–330.
- [32] KETS EPW, de BONT JAM. Protective effect of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. *FEMS Microbiol Lett* 1994; **116**: 2510–2516.
- [33] KO R, SMITH LT, SMITH GM. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 426–431.
- [34] KYLMÄ AK, JOKELA J, LEISOLA M. Effect of glycine betaine on osmoadaptation of *Propionibacterium acidipropionici* cultivated in elevated osmolarities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; **54**: 705–710.
- [35] LUCHT JM, BREMER E. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine-betaine transport system ProU. *Microbiol Rev* 1994; **14**: 3–20.
- [36] LUCHT JM, DERSCH P, KEMPF B, BREMER E. Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled proU operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994; **269**: 6578–6586.
- [37] MALLI R, EPSTEIN W. Expression of the Kdp ATPase is consistent with regulation by turgor pressure. *J Bacteriol* 1998; **19**: 5102–5108.
- [38] NAU-WAGNER G, BOCH J, LE GOOD JA, BREMER E. High-affinity transport of choline-*o*-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 1999; **65**: 560–568.
- [39] POOLMAN B, GLAASKER E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* 1998; **29**: 397–407.
- [40] SCHLEGEL HG. Mikrobiologia ogólna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1996: 324–331.
- [41] SUKHAREV SI, BETANZOS M, CHIANG CH-S, GUY HR. The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* 2001; **409**: 720–724.
- [42] SUKHAREV SI, BLOUNT P, MARTINAC B, BLATTNER FR, KUNG C. A large-conductance mechanosensitive channel in *Escherichia coli* encoded by MscL alone. *Nature* 1994; **368**: 265–268.
- [43] SUKHAREV SI, BLOUNT P, MARTINAC B, KUNG C. Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Ann Rev Physiol* 1997; **59**: 633–657.
- [44] SUKHAREV SI, DURELL SR, GUY HR. Structural models of the MscL gating mechanism. *Biophys J* 2001; **81**: 917–936.
- [45] SUKHAREV SI, SCHROEDER MJ, MCCASLIN DR. Stoichiometry of the large conductance bacterial mechanosensitive channel of *Escherichia coli*. A biochemical study. *J Membrane Biol* 1999; **171**: 183–193.

- [46] VERHEUL A, GLAASKER E, POOLMAN B, ABEE T. Betaine and L-carnitine transport in response to osmotic signals in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Bacteriol* 1997; **179**: 6979–6985.
- [47] von BLOHN C, KEMPF B, KAPPES RM, BREMER E. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and alternative transcription factor sigma b. *Mol Microbiol* 1997; **25**: 175–187.
- [48] WHATMORE AM, CHUDEK JA, REED RH. The effects osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 1990; **136**: 2527–2535.
- [49] WHATMORE AM, REED RH. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J Gen Microbiol* 1990; **136**: 2521–2526.
- [50] YANCEY PH. Compatible and counteracting solutes. [w] Strange K [red.] Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. London, Tokyo: CRC Press 1994: 81–109.
- [51] YANCEY PH, CLARK ME, HAND SC, BOWLUS RD, SOMERO GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 1982; **217**: 1214–1222.
- [52] YANCEY PH, SOMERO GN. Osmolytes and cell volume regulation: physiological and evolutionary principles. [w] Hoffman JF, Jamieson JD [red.] Handbook of Physiology. Oxford Univ Press 1997; **14**: 441–484.

*Redaktor prowadzący – Szczepan Biliński*

*Otrzymano: 27.12.2001 r.*

*Przyjęto: 19.03.2002 r.*

*Adres autora: ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań*

*powaszy@au.poznan.pl*



## E-NTPDazy – ENZYMY UCZESTNICZĄCE W PROCESACH SYGNALIZACJI W CENTRALNYM UKŁADZIE NERWOWYM

E-NTPDases – ENZYMES INVOLVED IN SIGNALLING PROCESSES  
IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Filip KUKULSKI, Michał KOMOSZYŃSKI

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

*Streszczenie:* E-NTPDazy (*Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase family, E-fosfohydrolazy ATP*), nazywane wcześniej ekto-ATPazami i ekto-apirazami, są enzymami, które w obecności milimolowych stężeń kationów dwuwartościowych hydrolizują pozakomórkowe tri- i difosfonukleotydy. Wiele dowodów wskazuje, że E-NTPDazy uczestniczą w procesach przekazywania informacji z udziałem ATP i purynoreceptorów P2. Funkcja E-fosfohydrolaz ATP w neurotransmisji nie ogranicza się jedynie do usuwania agonistów receptorów P2. Enzymy te poprzez utrzymywanie równowagi pomiędzy stężeniem ATP i adenyzy regulują również szybkość i intensywność odpowiedzi komórek na sygnał purynowy. Zachwianie równowagi [E-ATP]: [E-adenozyna] może prowadzić do wielu groźnych chorób. Jak dotąd nie wyjaśniono sensu występowania w przestrzeniach synaptycznych E-NTPDazy 2. Naszym zdaniem, enzym ten uczestniczy w obniżaniu wysokiego stężenia ATP w synapsie oraz tworzeniu z ATP innego neuroprzekaznika – ADP.

*Słowa kluczowe:* E-NTPDazy, ekto-enzymy, ekto-apirazy, ekto-ATPazy, ATP, centralny układ nerwowy.

*Summary:* The E-NTPDases (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family, E-phosphohydrolases ATP) belong to the family of enzymes previously called ecto-ATPases and ecto-apyrases, which hydrolyze a variety of ecto-tri- and ecto-diphosphonucleosides in presence of divalent cations. There is strong evidence that E-phosphohydrolases ATP are involved in signaling processes via ATP and purinoceptors. The function of those enzymes is not restricted to releasing agonist from purinoceptors. They also regulate the velocity and intensity of cell response to purinergic signal by maintaining the balance between concentration of ATP and concentration of adenosine. Lack of [ATP]:[adenosine] balance may lead to different diseases. The reason for existence of E-NTPDase 2 in synapse remains unclear. In our opinion E-NTPDase 2 participates in lowering the high ATP concentrations in synaptic cleft and degradation of ATP to another signaling molecule – ADP.

*Key words:* E-NTPDases, ecto-enzymes, ecto-ATPases, ecto-apyrases, ATP, central nervous system.

## 1. WSTĘP

E-NTPDazy (*Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase family*, *E-fosfohydrolazy ATP*) znane wcześniej jako ekto-ATPazy i ekto-apirazy są enzymami, które hydrolizują pozakomórkowe tri- i difosfonukleozydy [47,67]. Wszystkie E-fosfohydrolazy ATP, niezależnie od pochodzenia:

- 1) charakteryzują się niską specyficznością substratową,
- 2) są aktywowane przez kationy dwuwartościowe (najsilniej  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ),
- 3) mają alkaliczne optimum pH,
- 4) są niewrażliwe na inhibitory ATPaz (typu – P, V, F) i alkalicznych fosfataz,
- 5) ich aktywność jest modulowana przez lektyny, związki bifunkcjonalne (sprzęgające) i detergenty [33,47].

Poza tym, większość analizowanych NTPDaz wykazuje wyższe od ATPaz powinowactwo do ATP [33]. Sekwencje aminokwasowe sklonowanych dotychczas E-fosfohydrolaz ATP, tak rozpuszczalnych jak i membranowych, są w wysokim stopniu identyczne, natomiast poszczególni członkowie tej rodziny enzymów różnią się stosunkiem szybkości hydrolizy ATP do szybkości hydrolizy ADP ( $K_{sh}$ ) [67].  $K_{sh}$  stanowi główne kryterium podziału E-fosfohydrolaz ATP [67]. E-NTPDazy ulegają ekspresji w większości przebadanych komórek i tkanek [47]. Uważa się, iż podstawową funkcją tych enzymów jest regulacja poziomu wolnych nukleotydów di- i trifosforanowych w komórce i w przestrzeniach pozakomórkowych [32]. Ta cecha E-NTPDaz wykorzystywana jest do uwalniania purynoreceptorów P2 od agonów – ATP i ADP [32,34,69].

W niniejszej pracy przedstawiliśmy rezultaty badań oraz aktualne poglądy na funkcję, budowę molekularną i właściwości kinetyczne E-NTPDaz mózgu. W przeglądzie uwzględniliśmy też nową nomenklaturę omawianych enzymów [67].

## 2. BUDOWA MOLEKULARNA I WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE E-NTPDazy 1 (E-APIRAZY, CD39), E-NTPDazy 2 (E-ATPazy, CD39L1) I E-NTPDazy 3 (HB6, CD39L3)

W procesy neurotransmisji zaangażowane są dwie grupy NTPDaz. W skład pierwszej z nich, związanej ze strukturą membran i określanej jako E-NTPDazy wchodzi: E-NTPDaza 1, E-NTPDaza 2 i E-NTPDaza 3. Drugą, rozpuszczalną formę NTPDaz nazwano egzo-NTPDazami (e-NTPDazy) [47,67]. e-NTPDazy pojawiają się w przestrzeni pozakomórkowej jednocześnie z ATP [40].

### 2.1. Budowa molekularna E-NTPDaz

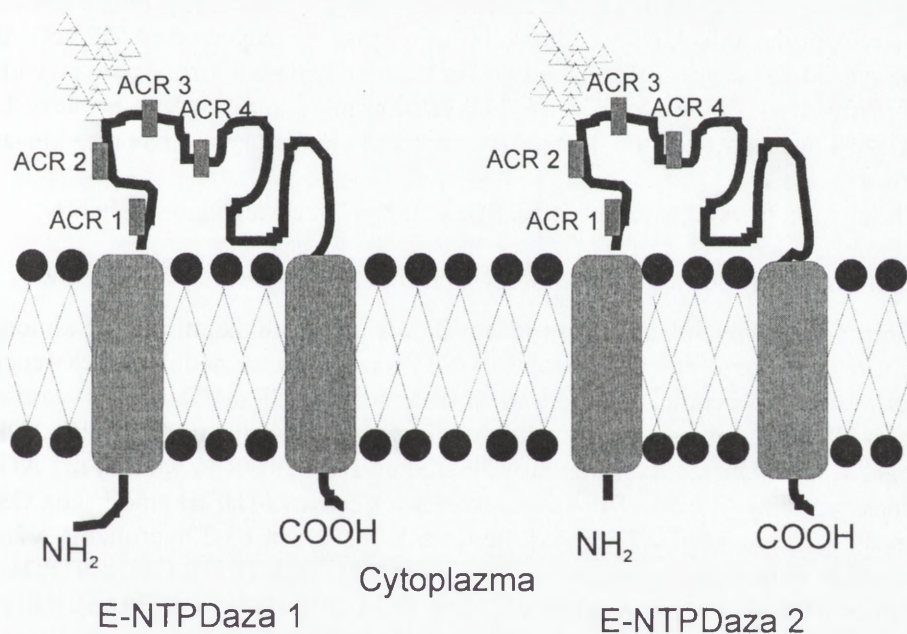
Przez wiele lat brak było wyraźnego postępu w poznawaniu właściwości fizykochemicznych E-NTPDaz. Wynikało to przede wszystkim z braku wydajnych metod



izolacji aktywnych katalitycznie E-fosfohydrolaz ATP z błon komórkowych i braku specyficznych inhibitorów E-apiraz i E-ATPaz [61]. Przełomem w poznawaniu budowy molekularnej omawianej grupy enzymów było odkrycie, iż sekwencja aminokwasowa apirazy łożyska ludzkiego jest identyczna z sekwencją aminokwasową antygenu CD39, który aktywuje limfocyty [11,39]. Ekspresja ludzkiego CD39 w komórkach hodowlanych COS-7 prowadziła do wzrostu hydrolizy pozakomórkowego ATP i ADP przez transfekowane komórki [59].

Dotychczas opisano budowę molekularną trzech E-NTPDaz mózgu – NTPDazy 1, NTPDazy 2 i NTPDazy 3 [27,50,61,68]. NTPDazy 1, 2 i 3 charakteryzują się zbliżoną masą cząsteczkową, która wynosi odpowiednio 57.4, 54.4 i 59 kDa. Po glikozylacji masa cząsteczkowa tych enzymów osiąga wartość 70–80 kDa [27,50,61,68].

E-fosfohydrolazy ATP mózgu zakotwiczone są w błonie komórkowej za pomocą dwóch domen transbłonowych połączonych dużą zewnątrzkomórkową pętlą. Końce N i C łańcucha polipeptydowego tych enzymów znajdują się w cytoplazmie (ryc. 1) [4,20,27,50,61]. Dla porównania, E-ATPaza wątroby szczura mimo wyraźnego podobieństwa w sekwencji aminokwasów do E-NTPDaz mózgu, ma tylko jedną domenę transbłonową (ryc. 2) [37]. W obrębie pętli zewnątrzkomórkowej E-NTPDaz można wyróżnić od 4 do 5 zakonserwowanych sekwencji aminokwasowych oznaczonych jako ACR (*apyrases conserved regions*) [19], zakonserwowane reszty cysteinowe (10) oraz liczne potencjalne miejsca glikozylacji (ryc. 2) [20,27,50,61].



RYCINA 1. Struktura E-NTPDazy 1 i E-NTPDazy 2: ACR1 – 4 – zakonserwowane domeny apirazowe;  $\Delta$  – reszty cukrowcowe

W łańcuchu polipeptydowym E-NTPDazy 1 występują także takie sekwencje aminokwasowe (np. FCSKNI i AVIA przy końcu N), które nie występują w strukturze E-NTPDazy 2 (ryc. 2) [50]. Podobnie E-NTPDaza 2 ma zakonserwowaną sekwencję N końcową – AKKVLPLLLPPLVXAALGLAXF, której nie stwierdzono w białku E-NTPDazy 1 (ryc. 2) [50]. E-NTPDaza 3 nie zawiera żadnej z wyżej wymienionych sekwencji (ryc. 2) [50].

Wydaje się, iż E-NTPDaza 3 może być pierwotną formą, z której powstały E-NTPDaza 1 i E-NTPDaza 2. Istnieją dwa podstawowe argumenty przemawiające za tą hipotezą – wysoka identyczność sekwencji aminokwasowej E-NTPDazy 3 do E-NTPDazy 1 i E-NTPDazy 2 (odpowiednio 0,35–0,38 i 0,38–0,40), oraz pośrednia wartość  $K_{sh}$  (2,75–3,6) tego enzymu w odniesieniu do E-ATPaz i E-apiraz [50].

Analiza sekwencji aminokwasowych E-fosfohydrolaz ATP mózgu wykazała, iż aktywność tych enzymów może być regulowana przez kinazy białkowe. Potencjalne miejsca fosforylacji zlokalizowano zarówno w domenach zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych E-NTPDaz. Pętla zewnątrzkomórkowa E-NTPDazy 2 może być fosforylowana przez kinazę białkową C (2 miejsca), kinazę kazeinową 2 (6 miejsc), kinazy zależne od cAMP i cGMP (po 1 miejscu). Dodatkowo, jedno potencjalne miejsce fosforylacji dla kinazy białkowej C znajduje się wewnątrz komórki [27]. Większość miejsc fosforylacji E-NTPDazy 3 znajduje się w pętli pozakomórkowej – cztery dla kinazy białkowej C, po jednym dla kinaz zależnych od cyklicznego AMP lub cGMP i dwa dla kinazy kazeinowej. Poza tym, 20-aminokwasowy koniec C tego białka zawiera miejsca fosforylacji dla kinazy białkowej C oraz kinaz zależnych od cAMP i cGMP [50]. Sugestie dotyczące fosforylacji E-NTPDaz zostały potwierdzone przez wyniki badań Wink i współpracowników [64]. Wyizolowana przez tą grupę badaczy E-NTPDaza 1 neuronów i astrocytów mózgu szczura była fosforylowana przez kinazy białkowe.

Właściwości fizykochemiczne E-NTPDaz mózgu przedstawiono w tabeli 1.

## 2.2. Znaczenie domen ACR w procesach wiązania i hydrolizy substratów

Mimo intensywnych badań prowadzonych wieloma technikami nie wyjaśniono dotychczas, dlaczego enzymy rodziny E-NTPDaz o bardzo podobnej sekwencji aminokwasowej i obecności zakonserwowanych regionów ACR mają tak różne wartości  $K_{sh}$ . E-NTPDaza 2 przeszło dziesięciokrotnie szybciej hydrolizuje ATP niż ADP, natomiast E-NTPDaza 1 hydrolizuje ADP średnio tylko 20–30% wolniej niż ATP. Stosunek hydrolizy ATP do ADP w transfekowanych enzymem HB6 komórkach COS-1 wynosił 2,75 lub 3,6 [20,23,50,68]. Ponadto E-NTPDaza 1 i 2 hydrolizują różne trifosfonukleotydy purynowe i pirymidynowe, takie jak: GTP, UTP, ITP, CTP, a NTPDaza 1 dodatkowo difosforany różnych nukleozydów: GDP, UDP, IDP i CDP [20,68]. Należy podkreślić, iż produktami hydrolizy ATP przez E-NTPDazę 1 jest zawsze AMP oraz  $2 P_i$ , podczas gdy E-NTPDaza 2 hydrolizuje ATP do ADP i  $P_i$  (ryc. 3) [20]. Żadna z opisanych E-NTPDaz nie hydrolizowała AMP [68]. Aktywność E-fosfohydrolaz ATP



E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>1</b>	MEDIKDSKVKRFRCSKNIILIGFSSVLAVIALIAVLGTHN
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>1</b>	MAGKLVSLVPLLLAAAGLTGLLLLCVPTQDV
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>1</b>	MFTVLTRQPCQAGLKLVRTPTIALVVLVSVVLSITVIQTHQVE
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>1</b>	MELASARLLRGQIPWRGLLTLASLLTYWSPLLTAQVTVDAVPPNVVEEK

## ACR 1

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>41</b>	KLPENVKYGIIVLDAGSSHTNLYIYKWPAEKENDTGVVQLLEECQVKGP
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>33</b>	REPPALKYGIIVLDAGSSHTSMFVYKWPADKENDTGVIGVGHSSCDVQGGG
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>50</b>	VLPPLKYGIIVLDAGSRTTVVYVQWPAEKENNTGVVSVQTKFCSVKGSG
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>50</b>	SVLLLAHNLQEFQVYVYKGTTLNPDSEIARYIRSDNMSKTGTAYSGR

## ACR 2

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>90</b>	GISKYAQKTDEIAAYLAECMKMSTERIPASKQHQTVPVYLGATAGMRLLR
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>82</b>	ISSYANDPSKAGQSLVRCLEQALRDVPRDRHASTPLYLGATAGMRPFNL
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>100</b>	ISSYGNPQDVPRAFEECMQKVKGVPSHLHGSTPIHLGATAGMRLRL
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>100</b>	ETGNNSNPMEGEPFVSLMCEPYTNNTSYLWSRNGESLSEGDRVTFSEGN

## ACR 3

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>139</b>	MESKQSADEVLAAVSRSLKSYPFDFQGAKIITGQEEGAYGWITINYLGG
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>131</b>	TSPEATARVLEAVTQLTQYPFDFRGARILSGQDEGVFGWWTANYLLEN
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>150</b>	QNETAANEVLESIQSYFKSQPFDFRGAQIISGQEEGVYGWITANYLMGN
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>150</b>	RTLTLNLNVRRTDKGYECEARNPATFNRSDFPNLDVYIGDPAPVISPPD

## ACR 4

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>188</b>	RFTQEQSWLNFISDSQKQATFGALDLGGSSQTQVTFVPLNQTLAPETSLL
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>180</b>	FIKYGWVGRWIRPKGTGLGAMDLGGASTQITFETTSPEDEPGNEVHLRL
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>200</b>	FLEKNLWHMWWVHPGVETTGALDLGGASTQISFVAGEKMDLNTSDIMQV
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>200</b>	IYHLQGSNLLNSCHADSNPPAQYFWLINEKLTQTSQELFISNITTNNSG

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>137</b>	QFRLYGTDYTVYTHSFLCYGKQDALWQKLAQDIQVSSGGILKDPFCYFG
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>229</b>	YQGHYRVYTHSFLCYGRDQILRLLASALQIHRFHPCWPKGYSTQVLLQ
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>250</b>	SLYGVYTYLTHSFLCYGRNEAEKFLAMLQNSPTKHNHLLTNPYPRDY
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>250</b>	TYACFVNNTVTGLSRTTVKNIITVFEVPTQPSIQITNTTVKELGSVTLTC

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>286</b>	YKVVNVSELYGTPCTKRFEKLLPFNQFQVQGTGDYEQCHQSILKFFNN
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>278</b>	EVYQSPCTMGQRPRAFNGSAIVLSGTSNATLRCRDLVSRLFNIISSCFPS
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>300</b>	SISFTMGHVFDLSLCTVDQRPESYNPNVDVITFEGTGDPSLCKEKVASIFD
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>300</b>	FSKDTGVSVRWLFNSQSLQLTRMRTLSDQNSTLRIIDPIKREDAGDQCEI

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>335</b>	SHPYSQCAFNGVFLPPLQGSFGAFSAFYVMDFFKKMANSVSSQEKM
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>327</b>	QCSFNGVFQPPVAGNFIAFSAFYTVDFLTTVMGLPVGTGLQLEEAETEI
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>350</b>	FKACHDQETCSFDGVYQPKIKGPFVAFAGPYTASALNLSGFSLDTFN
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>350</b>	SMPVSFRI SHPIKLDVDPDPTQGNGLSEGAIGAVIGSVAGVALIAAL

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>384</b>	TEITKNFCSKPWEVKASYPTVKEKYLSEYCFSGTYILSLLQGYNFTG
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>376</b>	TCNQWTWELQARVPGQKTRLADYCAVAMFIHQLLSRGYHFDERSFREVV
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>400</b>	SSTWNFCSQNWSQLPLLLPKFDEVIYARSYCFSANIYHFLVNGYKFTTEE
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>400</b>	AYFLYSRKTGGGSDHRDLTEHKPSTSSHNLGPSSDSSPNKVVDDVSYSVLN

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>433</b>	TSWDQIHFMGKIKDSNAGWTLGYMLNLTNMIAPAEQPLSPPLPHSTYISL
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>425</b>	FQKKAADTAVGWALGYMLNLTNLI PADLPGLRKGTHFSSWVALLLFTV
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>450</b>	HFEKEVGNSSIAWSLGYMLSLTNQIPAESPLRLPIEPPVFGVTLAFFT
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>450</b>	FNAQQSKRPTSASSPTETVYSVVKKK (476)

E-NTPDaza1	mózgu szczura	<b>482</b>	MVLFSLVLVAMVITGLFITFSKPSYFWKEAV (511)
E-NTPDaza2	mózgu szczura	<b>474</b>	LILAALVLLL (495)
E-NTPDaza3	mózgu człowieka	<b>500</b>	ATWPQIARLLCLAFLAYLCSATRRKRHSEHAFDHAVDSD (529)
Ekto-ATPaza	wątroby szczura	<b>500</b>	

RYCINA 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych mózgowych E-NTPDaz: czcionka pochyła – domeny transbłonowe; czcionka pogrubiona – zakonserwowane reszty cysteiny; podkreślono domeny ACR

TABELA 1 Nomenklatura i podstawowe właściwości strukturalne E-NTPDaz mózgu

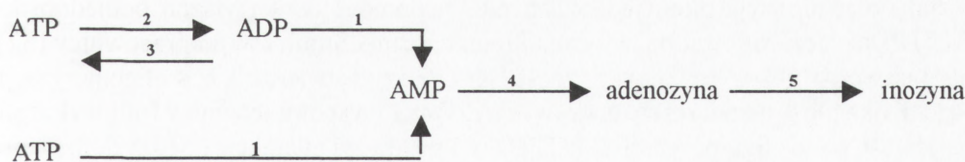
Nowa nazwa	Poprzednia nazwa	Elementy struktury
E-NTPDaza 1	CD39, ekto-apiraza, ekto-ATP difosfohydrolaza	<ul style="list-style-type: none"> <li>- masa cząsteczkowa 70–80 kDa</li> <li>- ACR 1-4</li> <li>- dwie domeny transbłonowe</li> <li>- sześćpotencjalnych miejsc glikozylacji</li> <li>- dziesięć zakonserwowanych reszt cysteinowych w pętli zewnątrzkomórkowej</li> </ul>
E-NTPDaza 2	CD39L1, ekto-ATPaza	<ul style="list-style-type: none"> <li>- masa cząsteczkowa 70–80 kDa</li> <li>- ACR 1-4</li> <li>- dwie domeny transbłonowe</li> <li>- siedem potencjalnych miejsc glikozylacji</li> <li>- dziesięć zakonserwowanych reszt cysteinowych w pętli zewnątrzkomórkowej.</li> <li>- miejsca fosforylacji dla E-kinazy białkowej C (2), E-kinazy kazeinowej 2 (6) oraz E-kinazy zależnej od cAMP i cGMP w pętli zewnątrzkomórkowej</li> <li>- jedno miejsce fosforylacji dla kinazy białkowej w części wewnątrzkomórkowej.</li> </ul>
E-NTPDaza 3	CD39L3, HB6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- masa cząsteczkowa 79 kDa</li> <li>- ACR 1-4</li> <li>- dwie domeny transbłonowe</li> <li>- siedem potencjalnych miejsc glikozylacji</li> <li>- dziesięć zakonserwowanych reszt cysteinowych w pętli zewnątrzkomórkowej</li> <li>- miejsca fosforylacji dla E-kinazy białkowej C (4), E-kinaz zależnych od cAMP i cGMP (po 1), E-kinazy kazeinowej (2) w pętli zewnątrzkomórkowej</li> <li>- miejsca fosforylacji dla kinazy białkowej C oraz kinaz zależnych od cAMP i cGMP w części wewnątrzkomórkowej.</li> </ul>

mózgu jest hamowana przez pochodne fosforanu pyridoxalu (PPADS) [25], a E-NTPDaza 1 i E-NTPDaza 3 są dodatkowo hamowane przez  $\text{NaN}_3$  [31,50].

Wykazano również, że E-NTPDaza 1 i 2 różnią się wrażliwością na niektóre związki będące antagonistami purynoreceptorów P2. E-NTPDazę 1 silniej hamuje błękit Evansa (*Evans blue*), podczas gdy suramina efektywniej hamowała aktywność E-NTPDazy 2 [68].

Panuje pogląd, iż domeny ACR budują miejsce wiązania substratów i jednocześnie centrum katalityczne NTPDaz [19,22,65]. Sekwencja aminokwasowa z regionów ACR 1 i ACR 4 E-fosfohydrolaz ATP jest homologiczna z sekwencjami aminokwasowymi motywów wiążących  $\beta$  i  $\gamma$  fosforany ATP białek rodziny heksokinaz (*actin/hsp70/*





RYCINA 3. Schemat przemian E-puryn w przestrzeniach pozakomórkowych: 1 – E-NTPDaza 1; 2 – E-NTPDaza 2; 3 – E-kinaza adenylanowa; 4 – E-5'-nukleotydaza; 5 – deaminaza E-adenozyny

*hexokinase family*) [19,45,51]. Wobec powyższego wydaje się, iż to właśnie ACR 1 i 4 odgrywają decydującą funkcję w wiązaniu substratów i ich hydrolizie. Jednak badania wykazały, iż w powyższych procesach biorą udział również pozostałe domeny ACR. Na szczególną rolę domen ACR w procesach katalizy wskazuje fakt, że usunięcie histydyny 59 lub argininy 67 z ACR 1, histydyny 135 z ACR 2 lub kwasu glutaminowego 182 z ACR 3 czy też seryny 224 z ACR 4 prowadzi do częściowej lub całkowitej utraty aktywności biologicznej E-NTPDaz [16,23,51,65].

Z drugiej jednak strony, apiraza trzustki pomimo braku w łańcuchu polipeptydowym regionów ACR 1-3, jest aktywnym fosfohydrolitycznym enzymem [26].

### 2.3. Aminokwasy wpływające na szybkość degradacji przez NTPDazy di- i trifosfonukleotydów

Interesującym, lecz nie do końca opisanym zagadnieniem jest mechanizm odpowiedzialny za istniejące między E-NTPDazami różnice w szybkości hydrolizy di- i trifosfonukleotydów. Dotychczasowe badania wykazały, iż różnice w wartościach  $K_{sh}$  E-fosfohydrolaz ATP wynikają z obecności lub braku w ich łańcuchach polipeptydowych określonych aminokwasów. Brak tryptofanu 459 w łańcuchu polipeptydowym E-NTPDazy 3 powodował wzrost aktywności NTPazowej i jednoczesny spadek aktywności NDPazowej tej hydrolazy [53]. E-NTPDaza 3 bez tryptofanu w pozycji 187 i 459 hydrolizowała jedenaście razy szybciej ATP niż ADP [53]. Natomiast mutacja polegająca na zamianie asparaginy 191 na alaninę zmieniała stosunek szybkości hydrolizy ATP do ADP z 3,6 do 0,88 przez 135% wzrost aktywności ADPazowej i 67% spadek aktywności ATPazowej w porównaniu z formą dziką enzymu [65]. Prezentowane wyżej rezultaty wyraźnie wskazują, że skład aminokwasowy regionów ACR ma istotny wpływ na powinowactwo E-NTPDaz do ATP i ADP.

### 2.4. IV-rzędowa struktura E-NTPDaz

Z dotychczasowych badań wynika, że większość E-NTPDaz występuje *in vivo* w formie oligomerów [22,28,49,52,55,60]. Rezultaty analiz przeprowadzonych z udziałem związków sprzęgających sugerują, że E-NTPDazy w membranach występują w formie homotetramerów, a różnice we właściwościach kinetycznych tych hydrolaz wynikają z różnic w siłach interakcji między monomerami kompleksu [29,30,35,55].

Jak dotąd nie wyjaśniono jednoznacznie, za pomocą jakich wiązań podjednostki E-NTPDaz łączą się ze sobą w formy oligomeryczne. Smith i współpracownicy [52] badając wpływ glikozylacji na aktywność E-NTPDazy 3 stwierdzili, iż w oligomeryzacji tego białka biorą udział reszty cukrowce. Wang i współpracownicy [60] wykazali natomiast, że do oligomeryzacji E-NTPDazy 1 prowadzą interakcje między domenami transbłonowymi monomerów. Fakt, iż również mutanty E-NTPDazy 1 mające tylko jedną domenę transbłonową występują w formie tetramerów świadczy, że jedna domena transbłonowa jest wystarczająca do oligomeryzacji tych enzymów. Jeszcze inna grupa badaczy [49] stwierdziła, iż w procesie formowania oligomerów E-NTPDaz istotną rolę odgrywają grupy -SH z zewnątrzkomórkowej pętli tych białek, które tworzą mostki dwusiarczkowe między monomerami.

### 2.5. Wpływ struktury IV-rzędowej na właściwości katalityczne E-NTPDaz

Niektórzy autorzy uważają, że struktura IV-rzędowa tych enzymów ma istotny wpływ na różnice w powinowactwie E-NTPDaz do substratów [18]. Stwierdzono bowiem, że aktywność E-NTPDazy 1 względem ATP i ADP jest regulowana przez interakcje pomiędzy domenami transbłonowymi podjednostek a zakonserwowanymi resztami H59 i N61 z regionu ACR 1. Autorzy sugerują, iż zmiany struktury IV-rzędowej wpływają na strukturę ACR 1 i modyfikują w ten sposób szybkość hydrolizy ATP i ADP [18].

## 3. ROZPUSZCZALNE FORMY NTPDaz

Pierwszą oczyszczoną, sklonowaną i zsekwencjonowaną rozpuszczalną NTPDazą była apiraza ziemniaka [19]. W tkankach ludzkich stwierdzono obecność dwóch rozpuszczalnych e-fosfohydrolaz ATP: e-NTPDazy 5 (CD39L4) i e-NTPDazy 6 (CD39L2) [10,21,42]. Występowanie e-NTPDazy 5 ogranicza się do układu krwionośnego. Synteza tego białka odbywa się w makrofagach, po czym jest ono uwalniane do krwi, gdzie obniża stężenie ADP [42].

Badania wykazały, iż rozpuszczalne NTPDazy mogą być uwalniane z komórek poddanych stymulacji elektrycznej lub działaniu bodźców mechanicznych [40,56,66]. Stymulacja elektryczna nerwów układu autonomicznego przewodu moczowego świnki morskiej uwalnia do przestrzeni synaptycznej jednocześnie ATP i rozpuszczalne e-fosfohydrolazy, które hydrolizują pozakomórkowe nukleotydy (ATP, ADP i AMP) do adenozyne [40,56]. Wyrzut E-fosfohydrolaz ATP i E-5'-nukleotydu na zewnątrz komórki jest następstwem wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w zakończeniach nerwowych. Na tej podstawie autorzy zasugerowali, iż podobnie do neurotransmiterów, niektóre rozpuszczalne hydrolazy są magazynowane w neuronach w postaci pęcherzyków. Enzymy i ATP mogą występować razem w tych samych pęcherzykach – w tym przypadku rozpuszczalne NTPDazy stają się aktywne dopiero w przestrzeni synaptycznej, natomiast we wnętrzu pęcherzyka ich aktywność jest hamowana przez kwaśne



pH (około 4) [56]. Nie wykluczone jest również, iż enzymy i ATP są magazynowane w osobnych pęcherzykach. Rozpuszczalne hydrolazy nukleotydów uwalniane z nerwów układu autonomicznego świnki morskiej, podobnie do E-NTPDaz nie są wrażliwe na inhibitory klasycznych ATPaz, natomiast są silnie hamowane przez suraminę i ARL 67156 [3,41,62]. Podobnie jak neurony układu autonomicznego, również komórki nabłonka naczyń krwionośnych poddane działaniu bodźców mechanicznych (*shear stress*) uwalniają do światła naczyń krwionośnych jednocześnie ATP oraz rozpuszczalne NTPDazy i 5'-nukleotyduzy [66].

Inny jest mechanizm tworzenia formy rozpuszczalnej E-NTPDazy 6 [21]. Enzym ten jest monomeryczną glikoproteiną o masie cząsteczkowej 50 kDa, która ulega ekspresji w wielu różnych tkankach. E-NTPDaza 6 staje się rozpuszczalna po proteolitycznym odcięciu 78 aminokwasowego peptydu sygnałowego. Enzym ten preferuje difosforany nukleotydów jako substraty i wykazuje najwyższe powinowactwo do GDP i IDP [21].

#### 4. FUNKCJA E-NTPDaz

Z wielu badań wynika, iż podstawową funkcją E-NTPDazy 1, zlokalizowanej w szczelinie synaptycznej lub płycie nerwowo-mięśniowej jest uwalnianie purynoreceptorów P2 od agonów (ATP i ADP). Przerwanie sygnału związanego ze stymulacją receptora P2 przez ATP i/lub ADP odbywa się dzięki hydrolizie obu tych nukleotydów do AMP (ryc. 3) [32,47,63]. E-NTPDazy modulując sygnał purynergiczny pośrednio uczestniczą w regulacji wielu ważnych procesów fizjologicznych, tj. wydzielanie hormonów, funkcjonowanie układu naczyniowo-sercowego, uczenie się i zapamiętywanie, odpowiedź immunologiczna, apoptoza, przewodzenie bólu, neurotransmisja, skurcz i rozkurcz mięśni gładkich oraz wzrost i regeneracja komórek [1,2,5,17,24,44]. E-NTPDazy 1 w kooperacji z E-5'-nukleotyduzami hydrolizują ATP i ADP do adenozyiny będącej ligandem purynoreceptorów P1 (ryc. 3) [32,63]. Apirazy obecne na powierzchni komórek endotelialnych naczyń krwionośnych degradując ADP, zapobiegają niekontrolowanej agregacji płytek krwi [32]. Nie wyjaśniona jest jeszcze funkcja E-NTPDazy 2, hydrolizującej ATP do ADP. Być może sensem działania tego enzymu jest tworzenie ADP – cząsteczki sygnałowej aktywującej niektóre z receptorów P2Y [48]. E-NTPDazy regulują również stężenie substratów dla E-kinaz białkowych [12] oraz uczestniczą w procesach adhezji komórkowej [13,14].

#### 5. E-NTPDazy A BIAŁKA ADHEZJI KOMÓRKOWEJ (CAM – CELL ADHESION MOLECULE)

W 1991 roku ukazała się praca dotycząca strukturalnego i immunologicznego podobieństwa pomiędzy wyizolowaną z wątroby szczura E-ATPazą i C-CAM 105

[36]. Relacje pomiędzy E-NTPDazami i białkami adhezji komórkowej do dnia dzisiejszego budzą kontrowersje [13,54]. Część badaczy uważa, iż E-fosfohydrolazy ATP są jednocześnie białkami adhezji komórkowej lub białka adhezji komórkowej mają zdolność hydrolizy ATP, co upodabnia je do NTPDaz [13,14]. W układzie nerwowym białka NCAM biorą udział w procesach prowadzących do tworzenia nowych połączeń pomiędzy neuronami, czyli tzw. plastyczności synaps [14]. Powyższe procesy leżą u podstaw między innym uczenia się i zapamiętywania. Istnieje hipoteza wyjaśniająca ścisły związek pomiędzy E-NTPDazami i białkami NCAM. ATP jest uwalniany do synaps przez neurony również w okresie między kolejnymi impulsami sygnalizacyjnymi. Ta porcja nukleotydu w aktywnych synapsach jest w sposób ciągły hydrolizowana przez E-NTPDazę 2. Chroni to białka adhezyjne synaps przed zależną od ATP proteolizą. Jednocześnie proteoliza białek NCAM eliminowałaby nieaktywne synapsy, a wynikiem tego procesu byłoby przerwanie połączenia nerwowego między neuronami [14]. Nowsze badania nad związkiem między białkami NCAM a E-NTPDazą 1 prowadzone z udziałem specyficznych przeciwciał sugerują, iż hydroliza ATP przez te enzymy osłabia siłę oddziaływania między komórkami [15].

## 6. UDZIAŁ E-NTPDazy 1 W PROCESACH UCZENIA SIĘ I ZAPAMIĘTYWANIA

Badania wykazały, iż ATP poprzez aktywację purynoreceptorów P2 może indukować w hipokampie zjawisko nazywane LTP (długotrwałe wzmocnienie) [63]. LTP odgrywa decydującą rolę w uczeniu się i zapamiętywaniu. Bonan i współpracownicy [5] analizowali zmiany aktywności E-NTPDazy 1 w procesie uczenia się. Stwierdzono, iż aktywność tego enzymu w hipokampie szczurów poddanych treningowi (*avoidance task*), po trzech godzinach od chwili jego zakończenia, była 33% niższa w porównaniu z aktywnością tego enzymu w hipokampie zwierząt z grupy kontrolnej. Obniżona aktywność E-NTPDazy 1 prowadziła do wzrostu stężenia ATP w przestrzeni pozakomórkowej, co z kolei warunkowało powstawanie LTP [5].

## 7. UDZIAŁ E-NTPDaz W ETIOLOGII NIEKTÓRYCH CHOROÓB

Pozycja chromosomowa ludzkiego CD39 (10q23.1 do q24.1) [39] pokrywa się z pozycją grupy genów odpowiedzialnych za występowanie epilepsji ogniskowej z objawami słuchowymi (10q22 do q24) [46]. Jednocześnie, aktywność E-NTPDazy 1 w hipokampie i w części skroniowej kory mózgowej ludzi chorych na epilepsję jest obniżona. Powyższe obserwacje mogą sugerować, iż mutacja w genie apirazy stanowi główną przyczynę epilepsji. Spadek aktywności apirazowej powodowałby wzrost stężenia pozakomórkowego ATP i jednocześnie obniżenie stężenia pozakomórkowej adenozyliny [43]. Podobnie, obniżoną aktywność E-NTPDazy 1 stwierdzono u myszy z padaczką słuchowopodobną [57]. Natomiast komórki kory mózgu i hipokampu szczurów z indukowaną padaczką skroniową (*lobe epilepsy*) charakteryzowały się wyraźnym



wzrostem aktywności ATP/ADPazowej, który utrzymywał się do około 100 dni od momentu wywołania padaczki [6]. Ten długotrwały wzrost aktywności E-NTPDazowej łagodził skutki epilepsji.

Niezwykle interesujące wyniki uzyskano w badaniach nad czerniakiem [15]. Wykazano, iż aktywność E-NTPDazy 1 w melanocytach rośnie wraz z rozwojem choroby. Wzrost aktywności E-apirazowej pokrywał się ze wzrostem ilości mRNA tego enzymu. Ponieważ E-NTPDaza 1 bierze udział w regulacji procesów adhezji komórkowej (poprzez hydrolizę ATP osłabia kontakt między komórkami) zasugerowano, iż nadekspresja apirazy w komórkach czerniaka redukuje kontakt limfocytów T z tymi komórkami i tym samym utrudnia rozpoznanie immunologiczne [15]. Potwierdzeniem tego są badania nad pasożytami człowieka, takimi jak: przywry (*Schistosoma mansoni*) oraz pierwotniaki z gatunku *Entamoeba*. Inwazyjne formy tych pasożytów charakteryzuje niemal 5-krotnie większa aktywność E-NTPDaz [8,58].

Z naszych badań nad rolą puryn w etiologii miażdżycy wynika, iż chorobie tej towarzyszą dramatyczne zmiany w stężeniu nukleotydów i nukleozydów adeninowych we krwi oraz w aktywności E-NTPDazy 1, E-NTPDazy 2, E-5'-nukleotydu i deaminazy E-adenozyny z naczyń krwionośnych ze zmianami miażdżycowymi [38]. Poznanie funkcji, a także mechanizmu regulacji aktywności tych enzymów może ułatwić skuteczną walkę z zawałami mózgu, degradacją komórek mózgu wywołaną niedotlenieniem, czy też z uwagi na rolę ATP w przenoszeniu sygnałów bólowych, w poznaniu etiologii migren [7,48,63]. Wykazano bowiem, iż ekspresja E-NTPDazy 1 i E-5'-nukleotydu wzrasta gwałtownie w obszarach mózgu szczura z indukowanym niedokrwieniem przejściowym przodomózgowia. Skutkiem działania tych enzymów jest wzrost poziomu pozakomórkowej adenozyne, która obniżając tempo metabolizmu chroni komórki z obszaru objętego niedokrwieniem przed śmiercią [7].

## 8. PODSUMOWANIE

Naszym zdaniem omawiane w tym przeglądzie enzymy odgrywają rolę znacznie większą niż przypisywana im funkcja zmiataczy agonów purynoreceptorów P2. Istotny jest fakt, że cząsteczki sygnałowe wydzielane z komórki (ATP) zostają, poza komórką, przekształcone w inne cząsteczki sygnałowe (ADP i adenozyne). Przemiany te odbywają się z udziałem szeregu E-enzymów, w tym E-NTPDazy 1 i E-NTPDazy 2 (ryc. 3).

W większości przypadków ATP i adenozyne, ATP i ADP oraz ADP i adenozyne w komórkach aktywują przeciwstawne procesy. W centralnym układzie nerwowym ATP stymuluje aktywność neuronów, podczas gdy adenozyne zwalnia tempo tych przemian [63]. ADP w układzie krwionośnym aktywuje agregację płytek, podczas gdy ATP (kompetycyjnie) i adenozyne (niekompetycyjnie) hamują ten proces [32]. E-NTPDazy regulują szybkość i intensywność odpowiedzi komórki na sygnał purynowy. Jeśli założymy, że pierwotnym sygnałem jest ATP (a wiele dowodów na to wskazuje),

to w wyniku przemian enzymatycznych poza komórką zawsze powstaje adenozyzna, a ilość tego związku dzięki aktywności E-hydrolaz rośnie proporcjonalnie do ilości ATP wydzielonego z komórki. W tkankach E-enzymy utrzymują równowagę między [E-ATP] i [E-adenozyną]. Z uwagi na ochronną funkcję adenozyzny (serce, centralny układ nerwowy) równowaga ta powoduje, iż tempo przemian w zdrowych komórkach pozostaje na takim poziomie, że komórki nie zostaną uszkodzone w wyniku np. niedotlenienia [7]. Taki sposób utrzymywania homeostazy nie wymaga dodatkowych czujników poziomu metabolitów, bowiem rolę ich pełnią E-enzymy, które regulują tempo przemian ATP w adenozyne.

Postęp, jaki dokonał się w badaniach nad neurotransmisją z udziałem nukleotydów purynowych, wyjaśnił wiele szczegółów dotyczących struktury, funkcji, mechanizmu i drogi, jaką sygnał nukleotydowy przenoszony jest do komórki [48,63]. Opisano również niektóre szlaki, jakimi sygnał propagowany jest w komórkach nerwowych [48]. Analiza genów pozwoliła na określenie różnic i podobieństw w sekwencji enzymów uczestniczących w degradacji di- i trifosfonukleotydów [9,10,28,39,50]. Nie wyjaśniono jednak, dlaczego komórki wytwarzają dwa E-enzymy o zróżnicowanym powinowactwie do substratów di- i trifosforanowych.

Z naszych badań wynika, że powinowactwo E-NTDPazy1 do ATP jest 10-krotnie większe od NTPDazy 2 [dane niepublikowane]. Wiadomo również, iż receptory P2Y<sub>1</sub> aktywowane przez ADP oraz P2Y<sub>2</sub> o wysokim powinowactwie do ATP jako liganda ulegają koekspresji w wielu typach komórek [48]. Powyższe obserwacje mogą sugerować, iż E-NTPDaza 2 uczestniczy w obniżeniu wysokiego poziomu ATP w synapsach oraz produkcji innego neurotransmitera – ADP. W ten sposób zostaje uruchomiony kolejny szlak transmisji sygnału np. mający na celu obniżanie wydzielania neuroprzekazników w tym ATP [48]. Nie jest do końca jasne, dlaczego E-NTPDazy są identyczne z antygenami lub CCAM-em [36,39,59]. Nie określono również roli tych enzymów w etiologii schorzeń centralnego układu.

## LITERATURA

- [1] ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *J Pharmacol* 1998; **78**: 113–145.
- [2] ABBRACCHIO MP, CERUTI S, BOLEGO C, PUGLISI L, BURNSTOCK G, CATTABENI F. Trophic roles of P2 purinoceptors in the central nervous system astroglial cells. [w] Chadwick DJ, Goode JA [red.] P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms. Chichester: John Wiley and Sons 1996: 142–148.
- [3] BAILEY SJ, HOURANI SMO. Differential effects of suramin on P2-purinoceptors mediating contraction of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1944; **112**: 219–225.
- [4] BATTASTINI AMO, EMANUELLI, KOESTER L, WINK MR, BONAN CD, DIAS RD, SARKIS JF. Studies on the anchorage of ATP diphosphohydrolase in synaptic plasma membranes from rat brain. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 669–678.
- [5] BONAN CD, ROESLER R, PEREIRA GS, BATTASTINI AMO, IZQUIERDO I, SARKIS JF. Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. *Brain Res* 2000; **854**: 253–256.



- [6] BONAN CD, WALZ R, PEREIRA GS, WORM PV, BATTASTINI AMO, CAVALHEIRO EA, IZQUIERDO I, SARKIS JF. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2000; **39**: 229–238.
- [7] BRAUN N, ZHU Y, KRIEGLSTEIN J, CULMSEE C, ZIMMERMANN H. Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 1998; **18**: 4891–4900.
- [8] CERBÓN J, OLGUÍN T. Ecto-nucleotide triphosphatase activity in pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: protection from the cytotoxic effects of extracellular ATP. *Microbios* 1997; **92**: 157–170.
- [9] CHADWICK BP, FRISCHAUF A-M. Cloning and mapping of human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm Genome* 1997; **8**: 668–672.
- [10] CHADWICK BP, FRISCHAUF A-M. The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* 1998; **50**: 357–367.
- [11] CHRISTOFORIDIS S, PAPAMARCAKI T, GALARIS D, KELLNER R, TSOLAS O. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur J Biochem* 1995; **234**: 66–74.
- [12] DUBYAK GR, EL-MOATASSIM C. Signal transduction via P<sub>2</sub>-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; **34**: C577–C606.
- [13] DZHANDZHUGAZYAN K, BOCK E. Demonstration of (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett* 1993; **336**: 279–283.
- [14] DZHANDZHUGAZYAN K, BOCK E. Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding. *Biochemistry* 1997; **36**: 15381–15395.
- [15] DZHANDZHUGAZYAN KN, KIRKIN AF, THOR STRATEN P, ZEUTHEN J. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Letters* 1998; **430**: 227–230.
- [16] DZHANDZHUGAZYAN KN, PLESNER L. Diethyl pyrocarbonate inactivates CD39/ecto-ATPase by modifying His-59. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1466**: 267–277.
- [17] FRANCESCHI C, ABBRACCHIO MP, BARBIERI D, CERUTI S, FERRARI D, ILIOU JP, ROUNDS S, SCHUBERT P, SCHULSE-LOHOFF E, RASSENDREN FA, STAUB M, VOLONTÉ C, WAKADE AR, BURNSTOCK G. Purines and cell death. *Drug Dev Res* 1996; **39**: 442–449.
- [18] GRINTHAL A, GUIDOTTI G. Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner. *Biochemistry* 2000; **39**: 9–16.
- [19] HANDA M, GUIDOTTI G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 916–923.
- [20] HEINE P, BRAUN N, HEILBRONN A, ZIMMERMANN H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* 1999; **262**: 102–107.
- [21] HICKS-BERGER CA, CHADWICK BP, FRISCHAUF A-M, KIRLEY TL. Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). *J Biol Chem* 2000; **275**: 34041–34045.
- [22] HICKS-BERGER CA, KIRLEY TL. Expression and characterization of human ecto-ATPase and chimeras with CD39 ecto-apyrase. *IUBMB Life* 2000; **50**: 43–50.
- [23] HICKS-BERGER CA, YANG F, SMITH TM, KIRLEY TL. The importance of histidine residues in human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3 as determined by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1547**: 72–81.
- [24] HILGELMANN DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol* 1997; **59**: 193–220.
- [25] HOFFMANN C, HEINE P, PRADEL G, KIM Y-CH, JACOBSON KA, ZIMMERMANN H. Inhibition of ecto-apyrase and ecto-ATPase by pyridoxal phosphate-related compounds. *Drug Dev Res* 2000; **51**: 153–158.
- [26] KACZMAREK E, KOZIAK K, SÉVIGNY J, SIEGEL JB, ANRATHER J, BEAUDOIN AR, BACH FH, ROBSON SC. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33116–33122.
- [27] KEGEL B, BRAUN N, HEINE P, MALISZEWSKI CR, ZIMMERMANN H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 1997; **36**: 1189–1200.
- [28] KIRLEY TL. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1076–1081.
- [29] KIRLEY TL, GERBER LK, SMITH TM. Expression and characterization of chicken muscle ecto-ATPase in mammalian COS cells. *IUBMB Life* 1999; **48**: 67–72.
- [30] KIRLEY TL, STOUT JG. Purification, characterization, and molecular cloning of the chicken gizzard smooth muscle ecto-ATPase. [w:] Plesner L, Kirley TL, Knowles AF [red.] Ecto-ATPases: recent progress on structure and function. New York, Plenum Press 1997: 111–126.

- [31] KNOWLES AF, NAGY AK. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur J Biochem* 1999; **262**: 349–357.
- [32] KOMOSZYŃSKI M. Apirazy – enzymy kontrolujące stężenie wolnych nukleotydów w komórkach i tkankach. *Post Bioch* 1994; **40**: 174–181.
- [33] KOMOSZYŃSKI M, WOJTCZAK A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1310**: 233–241.
- [34] KUKULSKI F, KOMOSZYŃSKI M. Sygnałowa funkcja ATP w centralnym układzie nerwowym. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 33–50.
- [35] LEWIS-CARL SA, SMITH TM, KIRLEY TL. Cross-linking induces homodimer formation and inhibits enzymatic activity of chicken stomach ecto-apyrase. *Biochem Mol Biol Int* 1998; **44**: 463–470.
- [36] LIN S-H, CULIC O, FLANAGAN D, HIXSON DC. Immunochemical characterization of two isoforms of rat liver ecto-ATPase that show an immunological and structural identity with a glycoprotein cell-adhesion molecule with *M* 105000. *Biochem J* 1991; **278**: 155–161.
- [37] LIN S-H, GUIDOTTI G. Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14408–14414.
- [38] ŁĘCKA J, MOLSKI S, KOMOSZYŃSKI M. Alteration of ectopurine metabolism in vascular disease. [w:] Vanduffel L, Lemmens R [red.] Ecto-ATPases and related ectonucleotidases, Maastricht, The Netherlands: Shaker Publishing BV 2000: 167–174.
- [39] MALISZEWSKI CR, DELESPESE GJT, SCHOENBORN MA, ARMITAGE RJ, FANSLow WC, NAKAKIMA T, BAKER E, SUTHERLAND GR, POINDEXTER K, BIRKS C, ALPERT A, FRIEND D, GIMPEL SD, GAYLE RB. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 1994; **149**: 3574–3583.
- [40] MIHAYLOVA-TODOROWA S, TODOROV LD, WESTFALL DP. Evidence for corelease of ATP and soluble nucleotidases from the sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens. [w:] Vanduffel L, Lemmens R [red.] Ecto-ATPases and related ectonucleotidases, Maastricht, The Netherlands: Shaker Publishing BV 2000: 21–30.
- [41] MIHAYLOVA-TODOROWA ST, WESTFALL DP, TODOROV LD. The characterisation of individual nucleotidases released from the sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens. [w:] Vanduffel L, Lemmens R [red.] Ecto-ATPases and related ectonucleotidases, Maastricht, The Netherlands: Shaker Publishing BV 2000: 31–38.
- [42] MULERO JJ, YEUNG G, NELKEN ST, FORD JE. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J Biol Chem* 1999; **274**: 20064–20067.
- [43] NAGY AK, HOUSER CR, DELGADO-ESCUETA AV. Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res* 1990; **529**: 192–201.
- [44] NEARY JT, BURNSTOCK G. Purinoceptors in the regulation of cell growth and differentiation. *Drug Dev Res* 1996; **39**: 407–412.
- [45] OSIPIUK J, WALSH MA, FREEMAN BC, MORIMOTO RI, JOACHIMIAK A. Structure of a new crystal form of human Hsp70 ATPase domain. *Acta Crystallogr* 1999; **D55**: 1105–1107.
- [46] OTTMAN R, RISCH N, HAUSER WA, PEDLEY TA, LEE JH, BARKER-CUMMINGS C, LUSTENBERG A, NAGLE KJ, LEE SK, SEHEUER ML, NEYSTAT M, SUSSER M, WILHELMSEN KC. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nature Genet* 1995; **10**: 56–60.
- [47] PLESNER L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 1995; **158**: 141–214.
- [48] RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Am J Pharmacol Exp Ther* 1998; **50**: 413–492.
- [49] SCHULTE AM ESCH II JS, SÉVIGNY J, KACZMAREK E, SIEGEL JB, IMAI M, KOZIAK K, BEAU-DOIN AR, ROBSON SC. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry* 1999; **38**: 2248–2258.
- [50] SMITH TM, KIRLEY TL. Cloning sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1386**: 65–78.
- [51] SMITH TM, KIRLEY TL. Site-directed mutagenesis of human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. *Biochemistry* 1999; **38**: 321–328.
- [52] SMITH TM, KIRLEY TL. Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase. *Biochemistry* 1999; **38**: 1509–1516.
- [53] SMITH TM, LEWIS CARL SA, KIRLEY TL. Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase. *Biochemistry* 1999; **38**: 5849–5857.
- [54] STOUT JG, BRITTSAN A, KIRLEY TL. Brain ecto-Mg-ATPase is not the neural cell adhesion molecule. *Biochem Mol Biol Int* 1994; **33**: 1091–1098.
- [55] STOUT JG, KIRLEY TL. Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular cross-linking modulates ATPase activity. *Biochemistry* 1996; **35**: 8289–8298.



- [56] TODOROV LD, MIHAYLOVA-TODOROWA ST, WESTFALL TD, SNEDDON P, KENNEDY CH, BJUR RA, WESTFALL DP. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 1997; **387**: 76–79.
- [57] TRAMS EG, LAUTER CJ. Ecto-ATPase deficiency in glia of seizure-prone mice. *Nature* 1978; **271**: 270–271.
- [58] VASCONCELOS EG, FERREIRA ST, DE CARVALHO TMU, DE SOUZA W, KETTLUN AM, MANCILLA M, VALENZUELA MA, VERJOVSKI-ALMEIDA S. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 22139–22145.
- [59] WANG T-F, GUIDOTTI G. CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9898–9901.
- [60] WANG T-F, OU Y, GUIDOTTI G. The transmembrane domains of ecto-apyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24814–24821.
- [61] WANG T-F, ROSENBERG PA, GUIDOTTI G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol Brain Res* 1997; **47**: 295–302.
- [62] WESTFALL TD, KENNEDY C, SNEDDON P. Enhancement of sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto ATPase inhibitor ARL 67156. *Br J Pharmacol* 1996; **117**: 867–872.
- [63] WINDSCHEIF U. Purinoceptors: from history to recent progress. A review. *J Pharm Pharmacol* 1996; **48**: 993–1011.
- [64] WINK MR, LENZ G, RODNIGHT R, SARKIS JF, BATTASTINI AMO. Identification of brain ecto-apyrase as a phosphoprotein. *Mol Cell Biochem* 2000; **213**: 11–16.
- [65] YANG F, HICKS-BERGER CA, SMITH TM, KIRLEY TL. Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of residues in the apyrase conserved regions. *Biochemistry* 2001; **40**: 3943–3950.
- [66] YEGUTKIN G, BODIN P, BURNSTOCK G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2000; **129**: 921–926.
- [67] ZIMMERMANN H, BEAUDOIN AR, BOLLEN M., GODING JW., GUIDOTTI G, KIRLEY TL, ROBSON SC, SANO K. Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolysing enzyme families expressed on the cell surface. [w]: Vanduffel L, Lemmens R [red.] Ecto-ATPases and related ectonucleotidases, Maastricht, The Netherlands: Shaker Publishing BV 2000: 9–20.
- [68] ZIMMERMANN H, BRAUN N, HEINE P, KOHRING K, MARXEN M, SÉVIGNY J, ROBSON SC. The molecular and functional properties of E-NTPDase 1, E-NTPDase 2 and ecto-5'-nucleotidase in nervous tissue. [w]: Vanduffel L, Lemmens R [red.] Ecto-ATPases and related ectonucleotidases. Maastricht, The Netherlands: Shaker Publishing BV 2000: 9–20.
- [69] ZIMMERMANN H, BRAUN N, KEGEL B, HEINE P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int* 1998; **32**: 421–425.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 18.10.2001 r.

Przyjęto: 18.02.2002 r.

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





## EKSPERYMENTALNE I KLINICZNE PRÓBY LECZENIA NOWOTWORÓW Z UŻYCIEM GENU DLA INTERLEUKINY 12 (IL-12)

EXPERIMENTAL AND CLINICAL APPLICATION OF INTERLEUKIN 12  
(IL-12) GENE-BASED THERAPY IN TUMOUR TREATMENT

Grzegorz BASAK, Witold LASEK

Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

**Streszczenie:** Strategia dotycząca modyfikacji komórek genami dla cytokin jest intensywnie rozwijającym się kierunkiem terapii genowej nowotworów. W licznych badaniach wykazano, że jednym ze skuteczniejszych podejść terapeutycznych jest wprowadzanie genu dla interleukiny 12 (IL-12) w celu indukcji jej miejscowego uwalniania. Unika się w ten sposób ciężkich efektów toksycznych powodowanych przez IL-12 podawaną systemowo. Najlichniesze prace eksperymentalne dotyczą podawania komórek nowotworowych modyfikowanych genem dla IL-12 *ex vivo*, używanych jako szczepionki. Wykazano także wysoką skuteczność fibroblastów z wprowadzonym genem dla IL-12. Dzięki modyfikacji komórek dendrytycznych genem dla IL-12 udało się również wzmocnić skuteczność związanych z nimi strategii terapeutycznych. Postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej pozwolił na wprowadzanie genów dla IL-12 *in vivo*, poprzez transfer genów za pomocą adenowirusów, a także wirusów ospy lub opryszczki. Niewirusowe metody transferu genu dla IL-12 obejmowały bezpośrednie podawanie plazmidu do mięśni poprzecznie prążkowanych, skóry lub tkanki nowotworowej. Skuteczność transferu potęgowana była przez elektroporację lub zastosowanie metody „wstrzeliwania” DNA. Podjęto nawet próby terapii genem dla IL-12 podając ten gen doustnie. Efektywność terapii nowotworów genem dla IL-12 wzmagana była poprzez jednoczesne zastosowanie cytokin: IL-2, -15, -18, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , chemokin IP-10 i MIG, wprowadzenie genów dla cząsteczek kostymulujących B7.1 i 4-1BB oraz dołączenie terapii adoptywnej. Przeprowadzone na zwierzętach badania udowodniły skuteczność terapeutyczną modyfikacji komórek genem dla IL-12. Pozwoliło to na podjęcie pierwszych prób klinicznych.

**Słowa kluczowe:** IL-12, terapia genowa nowotworów

**Summary:** The strategy concerning the modification of cells with genes encoding cytokines is an intensively developing branch of tumour gene therapy. Many experiments show that inserting IL-12 gene into cells is one of the most effective therapeutic approaches. IL-12, when produced in the tumour microenvironment efficiently stimulates antitumour immunity, preventing severe toxicities caused by IL-12 given systemically. The majority of research papers concern the therapy with *ex vivo* IL-12 gene modified tumour cells, used as antitumour vaccines. High therapeutic efficiency of fibroblasts mo-

dificated to secrete IL-12 has also been shown. Further, insertion of IL-12 gene into dendritic cells made these cells highly efficient and improved their function as antitumour vaccine. The development of genetic engineering methods has allowed *in vivo* transduction of cells with IL-12 gene, by adenoviral gene transfer as well as Vaccinia Virus or Herpes Simplex Virus vectors. Nonviral IL-12 gene transfer methods used direct injection of naked DNA into skeletal muscles, skin or tumour tissue. The effectiveness of gene transfer has been improved by electroporation or the gene gun method. Also the trial with IL-12 gene given *per os* has already been undertaken. The efficacy of tumour gene therapy with IL-12 gene has been enhanced by simultaneous administration of cytokines: IL-2, -15, -18, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , chemokines: IP-10 and MIG, insertion of genes for costimulatory molecules B7.1 and 4-1BB and also by addition of adoptive therapy approaches. The experiments in animal models have documented the therapeutic effectiveness of modification of cells with IL-12 gene. As a result of that, the first clinical trials have been undertaken.

*Key words:* IL-12, tumour gene therapy

## 1. WSTĘP

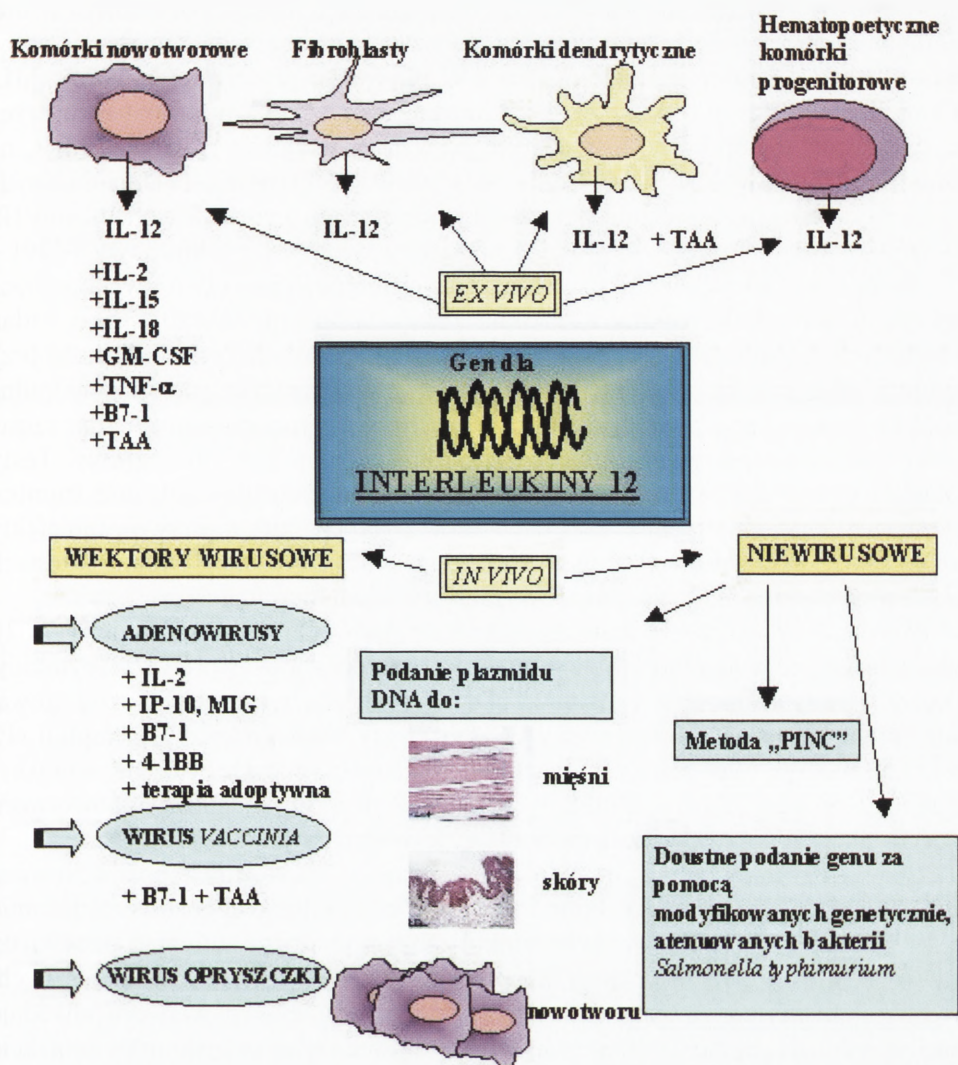
Już od ponad 10 lat, w wielu próbach terapii nowotworów wykorzystuje się metody inżynierii genetycznej. Jeden z głównych kierunków terapii genowej ma wpływać na zwiększenie efektywności odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworowi, poprzez modyfikację materiału genetycznego komórek gospodarza. U podłoża tego postępowania leży hipoteza, mówiąca o możliwości odwrócenia stanu anergii lub tolerancji układu immunologicznego pacjenta w stosunku do komórek nowotworowych, co może prowadzić do wyleczenia nowotworu [30]. Aby to osiągnąć, należy zwiększyć skuteczność prezentacji antygenów nowotworowych komórkom efektorowym układu immunologicznego.

Opierając się na tych przesłankach, stosowano początkowo niezdolne do proliferacji komórki nowotworowe (np. napromieniane promieniami Roentgena) w połączeniu z różnymi adjuwantami np. z BCG. Po odkryciu molekularnej budowy niektórych antygenów nowotworowych oraz kodujących je genów, podawano pacjentowi określone determinanty antygenowe w postaci peptydów lub DNA. Następnie, zaczęto modyfikować komórki nowotworowe genami cytokin, cząsteczek kostymulujących, cząsteczek układu HLA i innych. Kolejne strategie obejmowały modyfikację genetyczną limfocytów, komórek prezentujących antygen, jak również komórek innych tkanek położonych w miejscu nowotworu lub dystalnie.

Już w 1988 r. [11] opublikowano pierwszą pracę donoszącą o skuteczności terapeutycznej komórek nowotworowych modyfikowanych *ex vivo* genami dla cytokiny - IL-2. Od tej pory były prowadzone liczne eksperymenty obejmujące transfer genów dla wielu różnych cytokin. Skuteczność ich w badaniach przedklinicznych różniła się m.in. w zależności od badanego nowotworu. Jedną z najefektywniejszych strategii wydaje się być wprowadzanie genu dla interleukiny 12 (IL-12) (ryc. 1).

Interleukina 12 jest heterodimeryczną glikoproteiną, składającą się z połączonych mostkiem dwusiarczkowym podjednostek 35 i 40 kD. Po raz pierwszy została opisana





RYCINA 1 Podsumowanie strategii terapeutycznych związanych z transferem genu dla IL-12 opisanych w tekście

w 1989 roku jako czynnik stymulujący komórki NK (NKSF). Wkrótce odkryto jej liczne, istotne biologiczne właściwości włączając stymulację cytotoxyczości i proliferacji komórek NK oraz limfocytów T cytotoxycznych (CTL), indukcję wydzielania cytokin i chemokin, zwłaszcza IFN- $\gamma$ , oraz udział w powstawaniu komórek typu Th1. Fizjologicznymi źródłami IL-12 wydają się być komórki prezentujące antygen (APC), takie jak makrofagi i komórki dendrytyczne. W ostatnich latach wykazano, że IL-12 jest jedną z najsilniej działających przeciwnowotworowo cytokin. Systemowemu

podaniu rekombinowanej, mysiej IL-12 towarzyszy wyraźna odpowiedź przeciwnowotworowa w wielu modelach eksperymentalnych u myszy. Pośredniczą w niej limfocyty T, prowadząc do regresji guzów, związanej często z wytworzeniem przeciwnowotworowej pamięci immunologicznej. W aktywności przeciwnowotworowej IL-12 w dużej mierze pośredniczy IFN- $\gamma$  wydzielany w miejscu nowotworu przez stymulowane komórki T i NK. Dochodzi do wzrostu ekspresji cząsteczek MHC na komórkach nowotworowych, indukcji syntazy tlenu azotu (NOS), uwalniania innych cytokin oraz hamowania angiogenezy, dzięki indukowaniu wydzielania chemokiny IP-10 (*IFN-inducible-protein 10*) przez komórki nowotworowe oraz limfocyty T [29].

Wobec obiecujących wyników leczenia mysich modeli nowotworów za pomocą rekombinowanej interleukiny 12, Atkins i wsp. [7] przeprowadzili fazę I badań klinicznych. Ujawniła ona znaczną toksyczność IL-12 podawanej systemowo. Już przy minimalnej dawce dożylniej 3 ng/kg IL-12 występowała gorączka z dreszczami trudna do zlikwidowania przy pomocy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Inne częste dolegliwości obejmowały: zmęczenie, nudności, wymioty i ból głowy. Testy laboratoryjne wykazywały anemię, neutropenię, limfopenię, hiperglikemię, trombocytopenię i hipoalbuminemię. Przy dawce IL-12 1000 ng/kg zaobserwowano efekty toksyczne zmuszające do jej zmniejszenia – zapalenie jamy ustnej i zmiany w testach wątrobowych, przede wszystkim podwyższony poziom transaminaz.

W próbach systemowego zastosowania rekombinowanej IL-12 u człowieka [7,62], zaskakująco, nie wykazano istotnej skuteczności przeciwnowotworowej tej cytokiny. Ponadto, zasugerowano, że systemowe podanie IL-12 może indukować przejściową, uogólnioną immunosupresję u myszy [38]. Nieefektywność systemowej terapii IL-12 w klinice może być związana z niemożnością osiągnięcia przez tę cytokinę, w maksymalnej, tolerowanej dawce, skutecznych stężeń w łożysku naczyniowym nowotworu i/lub indukcją uogólnionego zahamowania odpowiedzi limfocytów T [23].

Ryzyko toksyczności i uogólnionej immunosupresji znika, gdy terapia stosowana jest miejscowo. Już w 1988 r. Forni i wsp. [24] wykazali, że doguzowe podawanie niskich dawek rekombinowanych cytokin może wybiórczo zmieniać odpowiedź przeciwnowotworową gospodarza, nie powodując znacznych efektów toksycznych. Według aktualnej teorii zwiększone stężenie cytokiny w miejscu nowotworu powoduje lokalną rekrutację komórek zapalnych, które bezpośrednio lub pośrednio (po kontakcie z limfocytami T) mogą zniszczyć co najmniej część komórek guza, uwalniając ich antygeny. Antygeny te, w formie białek, peptydów lub ciałek apoptotycznych, są przejmowane przez komórki dendrytyczne, które migrują do węzłów chłonnych. Tam wchodzi w interakcję z dziewiczymi limfocytami T. Aktywując je, dają początek specyficznej odpowiedzi immunologicznej [37].

W 1993 r. Brunda i wsp. [10] udowodnili, że po podaniu doguzowym IL-12, można całkowicie wyleczyć nawet do 50% myszy z nowotworem. Efekt hamujący wzrost guza był tym silniejszy, im wyższa była dawka cytokiny, a przy podaniu miejscowym nie obserwowano też ogólnej toksyczności. Wysoka skuteczność miejscowego działania cytokiny wymaga jednak trudnego do kontrolowania systemu wstrzyknięć doguzowych.



Powstały więc projekty, według których IL-12 mogłaby być wydzielana parakrynnie w miejscu guza, wzbudzając efektywną odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko jego komórkom.

Wydaje się jednak, że skuteczność uwalnianej miejscowo IL-12 może zależeć także od jej działania systemowego [85]. IL-12 może wtedy funkcjonować w krążeniu jak hormon, regulując odporność organizmu. Według niektórych badaczy [16], w określonych modelach doświadczalnych podanie systemowe IL-12 cechuje się jednak wyższą skutecznością niż podanie miejscowe. Według nich, w badanym modelu nowotworu jelita grubego C26 u myszy, systemowe podanie IL-12 w dawce 1 µg/dobę daje wręcz te same skutki, co 30–80 pg/ml IL-12 uwalnianej w miejscu nowotworu.

## 2. TERAPIA KOMÓRKAMI MODYFIKOWANYMI GENEM DLA IL-12 *EX VIVO*

### 2.1. Szczepionki z komórek nowotworowych wydzielających IL-12

Komórki szczepionki uzyskuje się z masy nowotworowej usuniętej podczas zabiegu chirurgicznego bądź też z pobranych biopsyjnie wycinków guza. Po wprowadzeniu genu dla cytokiny do komórek oraz ich namnożeniu są one napromieniowywane w celu zahamowania proliferacji, a następnie podawane pacjentowi. Niektórzy badacze postulują możliwość zastąpienia uzyskanych w ten sposób autologicznych komórek szczepionki gotowymi, allogenicznymi liniami komórek o zbliżonym profilu antygenowym. Wiele prac dowodzi jednak wyższej skuteczności szczepionek autologicznych. Dają one największą gwarancję zgodności komórek szczepionki i nowotworu pod względem antygenowym. Jednak, modyfikacja genetyczna autologicznych komórek nowotworowych pobranych uprzednio od pacjenta, musi być wysoce zindywidualizowana, kosztowna i pracochłonna. Wyprowadzenie stosownych klonów komórek do zastosowania w szczepionce, o ile jest możliwe, trwa tygodnie lub nawet miesiące.

Inne strategie, omijające problemy związane z wprowadzaniem genu do komórek autologicznych, obejmują podawanie mieszaniny napromienionych komórek autologicznych z modyfikowanymi genetycznie komórkami nowotworowymi allogenicznymi, komórkami innymi niż nowotworowe lub biopolimerowymi mikrosferami, wydzielającymi IL-12.

Skuteczność szczepionek wydzielających IL-12 zależy od wielu czynników:

- 1) ilości IL-12 wydzielanej w miejscu nowotworu [19] (tabela 1),
- 2) równowagi między ilością i szybkością lokalnego uwalniania cytokiny a tempem indukowanej przez nią śmierci komórek szczepionki,
- 3) ekspresji charakterystycznych antygenów.

TABELA 1. Poziom wydzielenia IL-12 przez komórki nowotworowe i fibroblasty modyfikowane jej genem *ex vivo*, w wybranych badaniach

Komórki nowotworowe modyfikowane genetycznie	Poziom wydzielenia IL-12	Piśmiennictwo
Ostra białaczka szpikowa (AML)	2,2–3,4 ng/10 <sup>6</sup> komórek/24 h	[24]
Ludzki czerniak	507 pg/10 <sup>6</sup> komórek/24 h	[78]
Rak jelita grubego C26	30–80 pg lub 5 ng/10 <sup>6</sup> komórek/48 h	[21]
BMK-16/myc	1,7–4,05 µg/10 <sup>6</sup> komórek/48 h	[32]
Czerniak B16	45 lub 40 ng/10 <sup>6</sup> komórek/24 h	[55]
Rak prostaty RM-9	2000 pg/10 <sup>5</sup> komórek/24 h	[36]
Rak drobnokomórkowy płuc N592	14,5+2,036 pg/5x10 <sup>5</sup> komórek/48 h	[23]
Rak płuca LLC	4–5 ng/5x10 <sup>5</sup> komórek/24 h	[82]
NXS2 neuroblastoma	4 ng/10 <sup>6</sup> komórek/24 h	[45]
Rak sutka MT-901	4 ng/10 <sup>6</sup> komórek/24 h	[6]
Rak jelita grubego C26	1–2 ng/10 <sup>6</sup> komórek/48 h	[69]
Rak nerki (Renca) RCC	146,7 ng/10 <sup>6</sup> komórek/48 h	[39]
Rak sutka SCK	1 lub 12 ng/10 <sup>6</sup> komórek/ 24 h	[22]
Fibroblasty modyfikowane genetycznie	120 ng/10 <sup>6</sup> komórek/48 h	[85]
		[72]
	1 ng/10 <sup>6</sup> komórek/24 h	[47]
	7,2 ng/10 <sup>6</sup> komórek/24 h	

W czasie gdy przeprowadzano pierwsze próby ze szczepionkami wydzielającymi cytokiny, nie znano jeszcze dokładnego profilu antygenów komórek nowotworowych użytych jako szczepionki (mogły zawierać małą liczbę antygenów lub antygeny w nieimmunogennej formie). Ekspresja szerokiego spektrum charakterystycznych dla



nowotworu antygenów oraz ich stężenie w komórkach transdukowanych genami dla cytokin są podstawowym warunkiem, dzięki któremu lokalna ekspresja cytokin może powodować aktywację specyficznych dla guza reakcji immunologicznych. Wydaje się, że wprowadzenie genów dla cytokin do komórek nowotworów mało immunogennych może prowadzić jedynie do skromnego wzrostu immunogenności lub do aktywacji niespecyficznych, nieefektywnych reakcji zapalnych.

Na modelach zwierzęcych przeprowadzono liczne próby terapii nowotworów za pomocą szczepionek z komórek nowotworowych wydzielających IL-12. Skuteczność szczepionki zależała w dużej mierze od modelu eksperymentalnego i typu badanego nowotworu [9,11,12,20,38,40–45 i in.].

Cavallo i wsp. [17] przeprowadzili eksperyment mający na celu porównanie skuteczności szczepionki z napromienionych komórek raka sutka TSA modyfikowanych genem dla IL-12 z terapią napromienionymi komórkami nowotworowymi wydzielającymi IL-2, -4, -7, -10, IFN- $\gamma$ , a także z terapią IL-12 podawaną systemowo. TSA/IL-12, w porównaniu z komórkami wydzielającymi inne cytokiny, najskuteczniej leczyły myszy z rosnącym już nowotworem. Zaskakująco, taki sam lub lepszy efekt osiągnięto jednak podając IL-12 i.p. w dawce nietoksycznej. Nienapromieniowane komórki TSA modyfikowane genami dla IL-12 nie tworzyły guza u większości myszy, co świadczyło o wzmożonej odporności przeciwnowotworowej. Jednak, po ponownym podaniu komórek szczepu dziękiego tym myszom, zaobserwowano znacznie słabszą odpowiedź zależną od pamięci immunologicznej niż w przypadku myszy, które odrzuciły komórki TSA wydzielające IL-4, IL-10 i IFN- $\gamma$ .

Rodolfo i wsp. [65] porównali natomiast skuteczność szczepionek z komórek raka jelita grubego wydzielających IL-12 albo IL-2 w stosunku do przerzutów w płucach, po podaniu podskórnym szczepionki. Podczas gdy szczepionka wydzielająca IL-12 wyleczyła 40% myszy, komórki modyfikowane genem dla IL-2 zmniejszyły jedynie liczbę przerzutów, nie wpływając na przeżywalność zwierząt.

Przeszkodą w immunoterapii szczepionkami wydzielającymi cytokiny jest fakt, że najczęściej skierowana jest przeciwko komórkom przerzutów, które podległy selekcji w kierunku zmniejszonej immunogenności, m.in. wskutek utraty powierzchniowych cząsteczek MHC. Zaletą szczepionek z komórek nowotworowych wydzielających IL-12 jest fakt, że może ona aktywować zarówno MHC zależną, jak i niezależną od MHC odpowiedź przeciwnowotworową. Nanni i wsp. [52] wykazali, że terapia genowa przy pomocy komórek z wbudowanym genem dla IL-12 może być skuteczna także w przypadku nowotworów pozbawionych cząsteczek MHC. Wagę tego spostrzeżenia podkreśla fakt, że wiele nowotworów wykazuje nieprawidłowości ekspresji cząsteczek HLA, np. aż do 88% nowotworów pochodzenia nabłonkowego.

Wykazano, że szczepionki z komórek nowotworowych wydzielających IL-12, silnie wpływają również na odpowiedź humoralną. Stwierdzono na przykład, że poziom przeciwciał IgG2a u myszy koreluje z wywołaną przez nie odpowiedzią przeciwnowotworową. Dane te sugerują możliwość monitorowania przebiegu terapii szczepionkami wydzielającymi IL-12, także w ujęciu klinicznym [63].

### 2.1.1. Próby wzmocnienia efektu szczepionek zawierających komórki nowotworowe wydzielające IL-12

Pomimo relatywnie dużej skuteczności komórek nowotworowych wydzielających IL-12, zaistniała potrzeba wzmocnienia właściwości terapeutycznych tej szczepionki. Opierając się na biologicznych mechanizmach jej działania, poszukiwano czynników działających z nią synergistycznie lub addycyjnie. Dotychczasowe badania obejmowały jednoczesne zastosowanie innych cytokin, cząsteczek kostymulujących lub wprowadzanych antygenów nowotworowych.

#### 2.1.1.1. Inne cytokiny

Opierając się na wynikach dotychczasowych eksperymentów z rekombinowanymi cytokinami, powstały projekty wzmocnienia efektu szczepionki za pomocą IL-2. Takada i wsp. [74] stworzyli komórki szczepionki z wprowadzonymi genami zarówno dla IL-12, jak i IL-2. Po podaniu dootrzewnowym zahamowały one powstawanie przerzutów raka jelita grubego do płuc w stopniu większym niż komórki wydzielające tylko jedną cytokinę. Tanaka i wsp. [76] na podstawie badań klonów podwójnych transduktantów ustalili, że skutek terapeutyczny zależy od stężenia IL-12 i IL-2 w miejscu nowotworu. Najlepiej, gdy stałe wydzielanie IL-12 było połączone z intensywną, lecz przejściową produkcją IL-2, co związane było z wprowadzeniem jej genu za pomocą nośnika adenowirusowego. Lode i wsp. [41] zapobiegli przerzutom po podaniu letalnej dawki słabo immunogennego nowotworu *neuroblastoma*, łącząc terapię szczepionką wydzielającą jednołańcuchową IL-12 (scIL-12) z ukierunkowanym dostarczeniem IL-2. Gen dla scIL-12 został wytworzony przez połączenie cDNA dla podjednostek p35 i p40 IL-12 za pomocą zawierającego 48 par zasad syntetycznego łańcucha, kodującego 15 aminokwasów. Aktywność biologiczna powstałego jednołańcuchowego białka stanowiła jedną szóstą aktywności standardowej, rekombinowanej IL-12. IL-2 została skierowana w miejsce nowotworu poprzez sprzęgnięcie z nią przeciwciała przeciwko gangliozydowi GD2, wykazującemu ekspresję na powierzchni guza.

Jak wykazano w naszym zespole, przejawiająca podobne do IL-2 właściwości immunostymulujące IL-15, synergizuje z IL-12 [40]. Di Carlo i wsp. [21] wszczepiali myszom nagim komórki nowotworowe produkujące IL-12 i IL-15. Uzyskali całkowite zahamowanie wzrostu modyfikowanych komórek, jak również wymieszanych z nimi komórek nowotworowych typu dzikiego. Zasugerowano główną rolę makrofagów i neutrofilów w regresji tych nowotworów. Ostatnio, w badaniach własnych (dane nieopublikowane) został przeprowadzony eksperyment znacznie bliższy zastosowaniu klinicznemu: podano doguzowo szczepionkę wydzielającą IL-12 w połączeniu z iniekcjami IL-15. Uzyskano bardzo obiecujące wyniki.

Wspólne właściwości IL-12, jak i IL-18 dotyczące promowania odpowiedzi komórkowej, zwiększania ekspresji receptorów IL-12 przez IL-18, jak również możliwości synergistycznej indukcji IFN- $\gamma$  przez te cytokiny doprowadziła do kolejnych rozwiązań terapeutycznych. Coughlin i wsp. [20] udowodnili, że wspólne podanie dwóch rodzajów zmodyfikowanych komórek, transdukowanych genami dla IL-12 lub



IL-18, w znacznie większym stopniu chroni przed następczym wzrostem komórek szczepu rodzicielskiego, jak również leczy wczesne postacie guza. Natomiast Nagai i wsp. [50] podawali IL-18 systemowo, w sztucznym modelu guza modyfikowanego genem IL-12, uzyskując znaczne zahamowanie jego wzrostu.

Aruga i wsp. [5] donieśli natomiast o korzystnym wpływie szczepionki złożonej z komórek z wprowadzonymi genami dla IL-12 oraz GM-CSF. Komórki uzyskane z lokalnych węzłów chłonnych drenujących obszar podania szczepionki wykazywały znacznie większą cytotoksyczność oraz skuteczność przeciwnowotworową po ich transferze adoptywnym. Obserwacje te sugerują, że IL-12 i GM-CSF działają immunomodulująco według różnych mechanizmów, a ich efekty uzupełniają się.

Jak wynika z badań własnych (Lasek i wsp. [39]), kombinacja terapii IL-12 i TNF- $\alpha$  może być bardziej efektywna niż leczenie pojedynczą cytokiną. Fujiwara i wsp. [26] stworzyli komórki nowotworowe podwójnie modyfikowane genami dla IL-12 oraz TNF- $\alpha$ . Wprowadzenie obu genów do komórek synergistycznie hamowało ich tumorogennosc, przypuszczalnie dzięki aktywacji komórek NK oraz wzmożeniu ekspresji cząsteczek MHC klasy I, II i B7.1.

#### 2.1.1.2. Geny dla cząsteczek kostymulujących

Cząsteczki B7 są rodziną białek błonowych, które oddziałując z receptorami na limfocytach T zapewniają sygnały modulujące odpowiedź immunologiczną. Wprowadzenie genów dla tych cząsteczek do komórek nowotworowych czyni te komórki bardziej immunogennymi. Zitvogel i wsp. [86] wykazali synergistyczny efekt wprowadzenia do komórek nowotworowych genów dla IL-12 i cząsteczki B7.1. Komórki tej szczepionki wykazywały znacznie mniejszą tumorogennosc oraz, po podaniu w miejscu dystalnym do komórek nowotworowych typu dzikiego, w znacznym stopniu spowalniały lub hamowały ich wzrost. Także Hallez i wsp. [31] wykazali, że dodatkowa modyfikacja komórek genem dla cząsteczki B7.1 powoli, lecz systematycznie poprawia odporność przeciwnowotworową indukowaną przez komórki wydzielające IL-12.

#### 2.1.1.3. Geny dla antygenów nowotworowych

Identyfikacja molekularnej struktury niektórych antygenów nowotworowych pozwoliła na produkcję szczepionek przeciwnowotworowych: peptydowych, komórek modyfikowanych *ex vivo* w celu zwiększenia ekspresji specyficznych antygenów nowotworowych oraz szczepionek opartych na kodującym je DNA. Wydaje się, że efekt tych szczepionek może zostać wzmożony przez transfer genu kodującego IL-12. Hallez i wsp. [31] zaproponowali model szczepionki z komórek wydzielających IL-12, transformowanych wirusem HPV-16. Uzyskano długotrwałą odpowiedź skierowaną przeciwko antygenowi E7, onkoproteinie obecnej w większości wywołanych tym wirusem nowotworów. Efekt ten tłumaczy się w dużej mierze indukcją przez IL-12 systemowej odporności typu Th1.

## 2.2. Komórki dendrytyczne (DC) modyfikowane genem dla IL-12

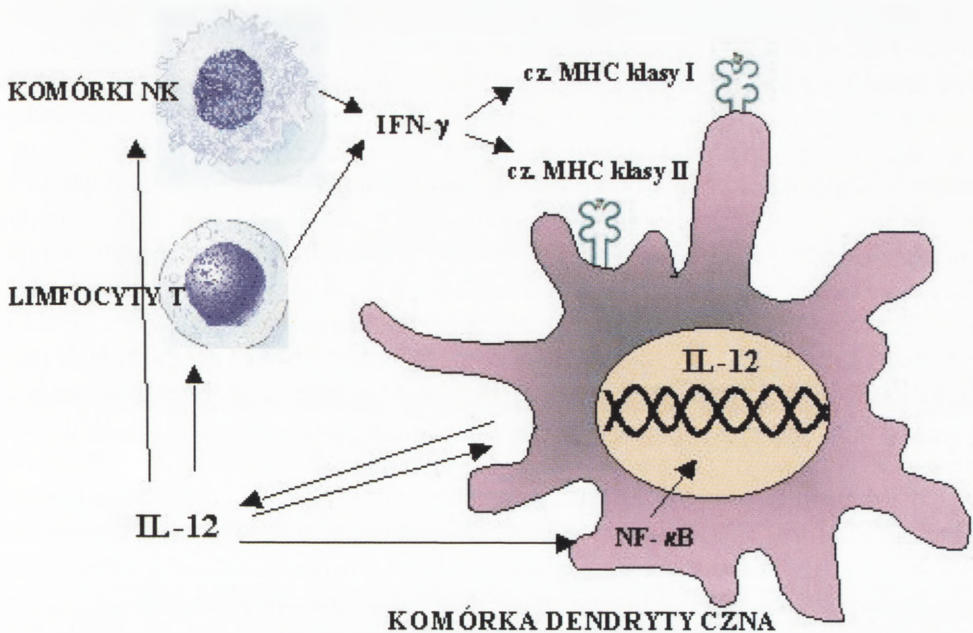
Badania dotyczące wczesnych etapów rozwoju odpowiedzi komórkowej przeciwnowotworowej wykazały, że DC są głównymi komórkami prezentującymi antygen stymulującymi efektywną odpowiedź limfocytów T. Aktywowane DC przejmują rozpuszczalny antygen lub ciała apoptotyczne, migrują do bogatej w limfocyty T, parakortycznej warstwy węzła chłonnego oraz rozpoczynają szereg zjawisk prowadzących do selekcji limfocytów T specyficznych dla antygeny i uwalniania właściwych sobie cytokin: IFN- $\gamma$  i IL-12. Dostarczanie DC modyfikowanych genetycznie cząsteczkami zwiększającymi ich miejscowe przeżycie i umiejętność wywoływania odpowiedzi, w miejsce antygeny nowotworowej, może prowadzić do ominięcia upośledzonych w mikrośrodoisku nowotworu wymagań ich selektywnej rekrutacji i miejscowej aktywacji.

Niemodyfikowane DC mogą produkować IL-12, ale tylko po interakcji cząsteczek CD40 i MHC klasy II z odpowiednimi cząsteczkami na limfocytach T. Stosowanie DC modyfikowanych genetycznie genami dla IL-12 wydaje się być wskazanym kierunkiem w terapii nowotworów. Pozwala on ominąć szereg trudności związanych ze stosowaniem innych szczepionek z komórek dendrytycznych. Przeszkodą dla strategii obejmujących „karmienie” DC syntetycznymi antygenami nowotworowymi lub wprowadzanie do nich DNA kodującego te antygeny jest fakt, że rozpoznawane przez limfocyty T epitopy antygenów nowotworowych zostały poznane tylko dla niewielu ludzkich nowotworów. Natomiast „karmienie” DC mieszaniną peptydów nowotworowych, lizatami komórkowymi bądź RNA napotyka problemy związane z preparacją próbek z ludzkich nowotworów litych. Stała produkcja IL-12 przez DC w połączeniu z ich możliwościami przejmowania i przetwarzania antygenów nowotworowych, migracji do węzłów chłonnych i indukcji efektywnej odpowiedzi immunologicznej powoduje, że stają się one skuteczniejsze niż nieprofesjonalne komórki prezentujące antygen [55].

Wykazano, że IL-12 wspólnie z DC wzmacnia odpowiedź CTL *in vitro* [9]. Tuting i wsp. [79] wykazali, że ludzkie DC kotransfekowane metodą „wstrzeliwania” plazmidów (*gene gun*) dla antygeny nowotworowej i IL-12 wzmacniały także specyficzną dla antygeny odpowiedź CTL *in vivo*. Na DC transdukowanych retrowirusowo genami dla IL-12 zaobserwowano zwiększoną liczbę cząsteczek MHC klasy I i II, prawdopodobnie częściowo dzięki aktywności samej IL-12, a bardziej prawdopodobnie dzięki wzrostowi produkcji IFN- $\gamma$  przez limfocyty T i NK. Efektywność transdukowanych DC może częściowo tłumaczyć fakt, że IL-12 działa bezpośrednio na DC promując lokalizację jądrową czynnika NF- $\kappa$ B, a także stymuluje DC do naturalnej produkcji tej cytokiny [55] (ryc. 2).

Obok zmian fenotypowych DC, ważny wpływ na odpowiedź przeciwnowotworową może mieć nadekspresja IL-12 przez DC w miejscu nowotworu lub alternatywnie, we wtórnych ośrodkach limfatycznych. Wykazano, że DC z wprowadzonym genem dla IL-12 mogą wywierać silniejszy efekt przeciwnowotworowy niż podobnie modyfikowane fibroblasty [55,27], wstrzykiwane doguzowo wektory adenowirusowe





RYCINA 2. DC transdukowane genem dla IL-12 wykazują zwiększoną ekspresję cząsteczek MHC klasy I i II. Prawdopodobnie wpływa na to wzrost poziomu IFN- $\gamma$  wydzielanego przez limfocyty T i komórki NK pod wpływem IL-12, a być może także aktywność samej IL-12. IL-12 działa również bezpośrednio na DC powodując aktywację oraz przemieszczenie do jądra czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, a także stymuluje DC do naturalnej produkcji tej cytokiny

kodujące IL-12 [27] lub nietransdukowane DC [55], silniej pobudzając odpowiedź typu Th1. Modyfikacja genetyczna nie upośledzała zdolności migracji DC do regionalnych węzłów chłonnych. Wykazano ich systemową, terapeutyczną aktywność przeciwnowotworową [55,46]. W efektach terapeutycznych pośredniczyły jednak tylko syngeniczne, lecz nie allogeniczne DC, co wskazuje, że wymagane były kompatybilne cząsteczki prezentujące antygen [46]. Szczepionki z modyfikowanych genetycznie DC były skuteczne także w leczeniu nowotworów mało immunogennych [3,69]. Wprowadzenie genu dla IL-12 do DC pozwala również wzmocnić efekt terapeutyczny szczepionek złożonych z komórek dendrytycznych z wprowadzonym genem dla antygeny nowotworowego. Chen i wsp. [18] wykazali korzystny wpływ terapeutyczny kotransdukcji DC genami IL-12 oraz ErbB-2/neu, potencjalnie immunogennego onkogenu związanego ze złym rokowaniem u pacjentów z rakiem sutka.

### 2.3. Fibroblasty modyfikowane genem dla IL-12

Już w 1994 roku Tahara i wsp. [73] wykazali skuteczność terapii nowotworów przy pomocy fibroblastów modyfikowanych genetycznie genem dla IL-12. Strategia

ta ma pozwolić na ominięcie szeregu problemów związanych z modyfikacją genetyczną komórek nowotworowych. W przeciwieństwie do komórek nowotworowych, fibroblasty bardzo łatwo mogą zostać pobrane od pacjenta, np. z materiału biopsyjnego, fragmentów usuwanych chirurgicznie tkanek lub po prostu ze skóry. Za pomocą prostych technik można wyodrębnić je spośród towarzyszących komórek, a w hodowli namnażają się szybko. Mogą również wydzielać cytokiny, jak IL-6, TNF- $\alpha$  lub GM-CSF, potencjalnie wykazujące synergizm z cytokiną kodowaną przez wprowadzony gen [85]. Wykazano, że fibroblasty z wprowadzonym genem wydzielają większe ilości cytokiny niż komórki nowotworowe modyfikowane w ten sam sposób [66]. Jednocześnie, terapia ta wydaje się być bezpieczna. W dotychczasowych badaniach nie wykazano jej efektów toksycznych. Fibroblasty mają niski potencjał migracyjny i nie tworzą guza w miejscu wstrzyknięcia [66]. Zauważono, że nie naciekają tkanek i nie migrują do płuc. Być może, nie wymagają więc napromieniowania przed podaniem. Nienapromieniane, syngeniczne fibroblasty przeżywają w przestrzeni otrzewnowej do 30 dni [66]. Fakt, że zanikają stopniowo, pozwalając na długotrwałą ekspresję transgenu, ma przemawiać za ich podawaniem w tej formie. Chcąc zabezpieczyć się przed ewentualnymi skutkami ubocznymi, można modyfikować je genami samobójczymi, pozwalającymi kontrolować ich żywotność. Jednak w badaniach prowadzonych przez Zitvogel i wsp. [85], napromieniowanie fibroblastów nie zmniejszało ich skuteczności *in vivo*.

Podobnie jak w przypadku modyfikowanych komórek nowotworowych, doświadczalnie stosuje się fibroblasty allogeniczne lub syngeniczne. Aruga i wsp. [4] wykazali wyższość fibroblastów syngenicznych posługując się modelem, w którym komórki te wydzielały GM-CSF. Badania nad szczepionką złożoną z fibroblastów wydzielających IL-12, prowadzone przez Zitvogel i wsp. [85], nie wykazały różnic w skuteczności fibroblastów autogenicznych i syngenicznych, a w obu przypadkach uzyskano znaczne zahamowanie wzrostu nowotworu.

Zitvogel i wsp. [85] udowodnili jako pierwsi, że fibroblasty wydzielające IL-12 mogą efektywnie leczyć zwierzęta nawet z dużym, zaawansowanym nowotworem *in situ* (podawane w 8. dniu) lub też nowotworem w miejscu dystalnym oraz jego przerzutami. Z ich badań wynika, że efekt przeciwnowotworowy fibroblastów modyfikowanych genem dla IL-12 jest głównie skutkiem systemowego oddziaływania aktywnej biologicznie IL-12. Wykazano bowiem, że skuteczność fibroblastów podanych w miejscu dystalnym do nowotworu nie była mniejsza niż przy ich podaniu doguzowym, choć w tym drugim przypadku efekty były obserwowane znacznie szybciej. Sugeruje się, że IL-12 dostarczana przez fibroblasty w miejscu guza może współdziałać z innymi cytokinami produkowanymi w miejscu nowotworu i/lub aktywować wcześniej promowane limfocyty naciekające nowotwór (TIL). W przypadku mało immunogennych nowotworów leczonych za pomocą doguzowego podania modyfikowanych fibroblastów, całkowite wyleczenie z nowotworu osiągnięto dopiero po modyfikacji jego komórek genem dla cząsteczki kostymulującej B7.1. Efekt przeciwrzerzutowy wzmocniono podając równocześnie systemowo niskie dawki IL-2.

Sanches i wsp. [66] oraz Matsumoto i wsp. [43] wykorzystali fibroblasty wydzielające IL-12 w celu ochrony przed wznową i przerzutami po resekcji pierwotnych



nowotworów, w modelu eksperymentalnym. Fibroblasty, podane i.p. myszom z rakiem jajnika rozsiانym do jamy otrzewnej, pozwoliły przedłużyć życie myszy oraz zmniejszyć masę nowotworową na przeponie [66]. Zastosowano w tym przypadku fibroblasty wyizolowane z materiału biopsyjnego raka jajnika. Natomiast szczepionka z mieszaniny modyfikowanych fibroblastów oraz napromienionych komórek nowotworowych zapobiegła nawrotowi choroby po resekcji gruczolaka jelita grubego [43].

Fibroblasty wydzielające IL-12 zostały już zastosowane w leczeniu nowotworów ludzkich. Kang i wsp. [35] przeprowadzili badania I fazy, podając fibroblasty okołoguzowo u pacjentów z rozsiانym czerniakiem. Zaobserwowano wpływ na odporność systemową, jak również skutki miejscowe. Leczeniu nie towarzyszyły znaczące klinicznie efekty toksyczne. W części przypadków guzy, także położone dystalnie, uległy zmniejszeniu, czemu towarzyszyła ich martwica krwotoczna.

#### 2.4. Inne komórki modyfikowane genem dla IL-12

Gautam i wsp. [28] zaproponowali dostarczanie IL-12 do szpiku kostnego w uzupełniającym leczeniu białaczki za pomocą modyfikowanych genetycznie hematopoetycznych komórek progenitorowych. Wykazywały się one stałą ekspresją transgenu, po podaniu myszom gwałtownie zwiększały produkcję IFN- $\gamma$ , a także wzmagaly właściwości cytotoksyczne splenocytów i komórek szpiku. Za pomocą tej metody wyleczono 40% myszy chorych na białaczkę.

### 3. TRANSFER GENU DLA IL-12 *IN VIVO*

*Ex vivo*, w celu modyfikacji komórek nowotworowych genem dla IL-12 używa się najczęściej wektorów retrowirusowych. Zapewniają one bowiem długotrwałą ekspresję transgenu, integrując się do chromosomów dzielących się komórek [49]. Jednak terapia obejmująca wprowadzanie genów *ex vivo* stwarza liczne problemy związane z kosztownym i czasochłonnym przygotowywaniem komórek szczepionkowych autologicznych oraz niepewną skutecznością wystandaryzowanych linii allogenicznych.

Postępy inżynierii genetycznej pozwoliły badaczom na podjęcie prób wprowadzania do komórek nowotworowych lub innych tkanek genu dla IL-12 *in vivo*. Tak jak w przypadku innych genów, metody wprowadzania genu dla IL-12 możemy podzielić na niewirusowe i wirusowe.

#### 3.1. Wirusowe metody transferu genu dla IL-12

Wektory retrowirusowe, choć zapewniają efektywny transfer genów *ex vivo*, nie są używane w terapii *in vivo*, głównie ze względu bezpieczeństwa, jak również niestabilności w tych warunkach [49]. Najczęściej używanym przez badaczy wektorem są adenowirusy, zapewniające wysoką efektywność *in vivo*, możliwość masowej produkcji, a także modyfikacji ich tropizmu oraz zastosowania bezpiecznych, replikujących się w organizmie wektorów [49].

Bezpośrednie podanie wektorów adenowirusowych przenoszących gen dla IL-12 w miejsce przerzutów wątrobowych raka jelita grubego pozwoliło na wydłużenie czasu przeżycia myszy [15]. Siders i wsp. [70] wykorzystali fakt, że wątroba jest pierwotnym miejscem infekcji po podaniu i.v. adenowirusów, do leczenia przerzutów wątrobowych raka nerki. Dożylnie podanie nośnika genu dla IL-12 pozwoliło znacznie zmniejszyć liczbę tych przerzutów. Podobnie, zastosowanie adenowirusów, przenoszących gen IL-12 w miejscu guza, zahamowało wzrost raka prostaty oraz proces tworzenia się przerzutów do płuc [54].

Podjęte są również liczne próby mające zwiększyć skuteczność terapii adenowirusowym nośnikiem genu dla IL-12. W tym celu Addison i wsp. [1] podawali równolegle, doguzowo adenowirusa przenoszącego gen dla IL-2. Uzyskali znacznie większą liczbę regresji zarówno nastrzykiwanych nowotworów, jak również zmian dystalnych w porównaniu do transferu samej IL-12. IP-10 oraz MIG są chemokinami należącymi do rodziny CXC. Wykazują one działanie chemotaktyczne, jak również hamują angiogenezę. Na modelu raka nerki wykazano, że aktywność przeciwnowotworowa IL-12 w dużym stopniu zależy od indukcji produkcji tych chemokin [77]. Palmer i wsp. [57] udowodnili, że doguzowe podanie wektorów adenowirusowych przenoszących geny dla chemokin IP-10 lub MIG (AdIP-10, AdMIG) w połączeniu z wektorami zawierającymi gen dla IL-12 (AdIL-12) daje efekt synergistyczny, prowadząc do regresji nowotworów. Jednocześnie, kombinacja AdIL-12 z AdIP-10 odznaczała się znacznie większą skutecznością. Także w badaniach prowadzonych przez Narvaiza i wsp. [53], terapia AdIP-10 synergizowała z AdIL-12, powodując całkowite wyleczenie z nowotworów nastrzykiwanych oraz dystalnych.

Część badaczy postanowiła zwiększyć skutki terapeutyczne adenowirusowego transferu genu kodującego IL-12 za pomocą wektorów adenowirusowych przenoszących równocześnie geny cząsteczek kostymulujących. Hull i wsp. [34] uzyskali znacznie lepsze efekty lecznicze podając doguzowo AdIL-12/B7.1 niż wówczas, gdy podawano tylko AdIL-12 [54]. 4-1BB jest cząsteczką kostymulującą, obecną na powierzchni aktywowanych limfocytów T, a jej interakcja z naturalnym ligandem (4-1BBL) wzmacnia odporność zależną od limfocytów T. Martinet i wsp. [42] zastosowali wektor AdIL-12/4-1BB w celu leczenia przerzutów wątrobowych raka jelita grubego. Wówczas znacznie wzrosła przeżywalność myszy, a także pobudzono systemową odporność przeciwko następczej zmianie nowotworowej. Nie zaobserwowano tego efektu przy podawaniu wektora AdIL-12.

Mazzolini i wsp. [44] wykazali natomiast synergizm terapii genowej genem dla IL-12 z terapią adoptywną, zarówno na etapie indukcji jak też w fazie efektorowej odpowiedzi limfocytów cytotoksycznych (CTL). Terapia za pomocą CTL uzyskanych od myszy, których guzy nowotworowe nastrzykiwane były wektorem adenowirusowym, przenoszącym geny dla IL-12 (AdIL-12), pozwoliła wyleczyć małe, wewnątrz-wątrobowe ogniska przerzutowe raka jelita grubego. W innym doświadczeniu, transfer CTL w połączeniu z doguzowym podaniem AdIL-12 wywierał efekt synergistyczny przeciwko dużym podskórnym zmianom nowotworowym także, gdy AdIL-12 podawane były w dawkach suboptymalnych. Najprawdopodobniej lokalne wydzielanie IL-12



wpływało na cząsteczki adhezyjne na komórkach śródbłonna naczyń nowotworu, co umożliwiło łatwiejsze naciekanie zmienionej tkanki przez podawane limfocyty [47].

Innymi wektorami wirusowymi, stosowanymi dotychczas w terapii genem IL-12 były wirusy Vaccinia (VV). Mają one szereg zalet jako wektor, m.in. dużą pojemność, dzięki czemu mogą prowadzić do ekspresji ogromnej liczby genów. Do 40% z 200 własnych genów VV może zostać zastąpione obcymi. Umożliwia to łączenie w jednym wektorze różnych genów terapeutycznych. VV zaraża szerokie spektrum komórek nowotworowych ludzkich i mysich, a obce geny zawarte w tym wektorze są poddawane wydajnej ekspresji. Meko i wsp. [45] jako pierwsi skonstruowali wektor VV przenoszący geny dla IL-12, wykazując jego znaczną aktywność terapeutyczną. Wykorzystując powyższe właściwości wirusa VV, skonstruowano też wektor przenoszący geny zarówno IL-12, cząsteczek kostymulujących B7.1, jak i modelowego antygeny nowotworowego [14]. Ich podanie i.v. w znacznym stopniu zahamowało wzrost przerzutów w płucach. Dalszą poprawę osiągnięto podając równocześnie systemowo IL-12.

Benett i wsp. [8] postanowili połączyć terapię genem dla IL-12 z właściwościami onkolitycznymi wirusa opryszczki (HSV). W tym celu stworzono wektor HSV/IL-12. Wykazano, że same wektory HSV podawane w wysokich dawkach mają silny potencjał onkolityczny i niszczą komórki nowotworowe. Dodatkowa ekspresja IL-12 pozwala na obniżenie dawek wirusa w terapii wirusowej, bez utraty aktywności przeciwnowotworowej.

### 3.2. Niewirusowy transfer genu dla IL-12

Spośród niewirusowych metod transferu genu kodującego IL-12, najprostszą metodą wydaje się być podawanie szczepionki DNA, czyli wolnego plazmidu zawierającego ten gen. Już w 1990 r. Wolff i wsp. [81] bezpośrednio wstrzyknęli do mięśni szkieletowych i sercowego u myszy wolny plazmid DNA, przenoszący gen znacznikowy. Następnie, zaobserwowali jego efektywną ekspresję w tych tkankach. Także wielu innych badaczy potwierdziło, że niektóre tkanki mogą przejmować i wykazywać ekspresję wolnego plazmidu DNA po jego bezpośrednim wstrzyknięciu. W 1996 r. Yang i wsp. [82] wprowadzili bezpośrednio plazmid DNA do komórek rosnącego nowotworu. W badanym modelu transgen zmniejszał swoją ekspresję w komórkach nowotworowych po 5 dniach, to jest znacznie szybciej niż w komórkach mięśnia szkieletowego – odpowiednio po 19 miesiącach [80], prawdopodobnie ze względu na większą stabilność w komórkach dzielących się. Jednak poziom ekspresji transgeny różni się znacznie pomiędzy różnymi nowotworami. Powstało wiele prac dotyczących terapii nowotworów za pomocą plazmidów DNA przenoszących gen dla IL-12. Plazmidy podawane były domięśniowo, do komórek skóry lub bezpośrednio w miejsce rosnącego nowotworu.

#### 3.2.1. Niewirusowy transfer genu dla IL-12 do mięśnia szkieletowego

Mięsień szkieletowy jest tkanką atrakcyjną dla strategii wprowadzania genów, ponieważ charakteryzuje się dużą masą, ma duże zdolności syntezy białek, jest łatwo osiągalny przez wstrzyknięcie i.m. oraz może przejmować plazmid po jego wstrzy-

knięciu. W doświadczeniu Schultza i wsp. [68], po domięśniowym wstrzyknięciu DNA kodującego IL-12, przeciwrprzerzutowy potencjał tej cytokiny utrzymywał się przez ponad miesiąc, z najwyższymi jej stężeniami w 20. dniu od rozpoczęcia terapii. Aby zwiększyć efektywność transferu nagiego DNA dla IL-12 do mięśni, Hanna i wsp. [32] posłużyli się elektroporacją. Jest to wysoce efektywna metoda, działająca przez przejściowe tworzenie porów w błonie komórkowej, przez które plazmid może dostać się do komórki.

### 3.2.2. Niewirusowy transfer genu dla IL-12 do skóry

Inni badacze wykorzystali możliwość transferu genów do komórek skóry. Fakt, że podlegają one intensywnej wymianie, umożliwia jedynie przejściową obecność i ekspresję transgenów, co znacznie zmniejsza ryzyko tej terapii. Tan i wsp. [75] wykazali, że wstrzyknięcie plazmidu DNA kodującego IL-12 do skóry indukuje systemową odpowiedź immunologiczną charakterystyczną dla IL-12, włączając efekty przeciwnowotworowe. Rakhmilevich i wsp. [61] posługiwali się metodą „wstrzeliwania” DNA, aby zwiększyć efektywność transfekcji. Polega ona na dostarczaniu genów do wnętrza wybranych komórek „wstrzeliwując” cząstki złota opłaszczone fragmentami DNA. Używając submikrogramowe ilości DNA, metodą „wstrzeliwania” DNA można wprowadzać do wnętrza komórek tysiące kopii genu, czego wynikiem jest wysoka ekspresja transgenów. Przy użyciu tej metody wprowadzano gen dla IL-12 do skóry pokrywającej guzy nowotworowe. Osiągnano całkowite regresje leczonych w ten sposób nowotworów, a strategia ta, połączona z resekcją guza macierzystego, znacznie hamowała powstawanie systemowych przerzutów. Efekt leczniczy w stosunku do rosnących nowotworów zależał jednak od ich typu. Nie zaobserwowano go np. w słabo immunogennym nowotworze 4T1 [59], jakkolwiek wykazano w tym przypadku efekt przeciwrprzerzutowy. Udowodniono jednocześnie, że o ile w leczeniu zmian miejscowych pożądane było wprowadzanie genów w pokrywającą je skórę, to efekt przeciwrprzerzutowy wywierała także modyfikacja skóry genem dla IL-12 w miejscu dystalnym [56]. Rakhmilevich i wsp. [60] udowodnili jednocześnie, że podobne efekty co przy terapii miejscowej przy pomocy „wstrzeliwania” DNA można osiągnąć podając systemowo wysokie dawki IL-12, lecz towarzyszy temu znaczna toksyczność.

### 3.2.3. Niewirusowy transfer genu dla IL-12 do tkanki nowotworowej

Inne strategie obejmują niewirusowe dostarczanie genu dla IL-12 bezpośrednio do komórek rosnącego nowotworu. Nagie DNA dla IL-12 było wprowadzane m.in. do guza Renca [12], osiągając umiarkowany efekt leczniczy. Za to, bezpośredni transfer tych genów do przerzutów czerniaka na modelu koni (rasy „gray horses”), powodował widoczną regresję zmian [33]. Song i wsp. [71] wykorzystali wolny plazmid zawierający gen dla IL-12 w celu wzmocnienia efektów szczepionki DNA, kodującej antygen nowotworowy CEA, osiągając znaczną poprawę.

Mendiratta i wsp. [48], w celu wprowadzenia genu dla IL-12 do komórek nowotworowych *in vivo*, wykorzystali metodę „polymeric, interactive, non-condensing” (PINC) dostarczania genów, o której było wiadomo, że zapewnia wyższy poziom



ekspresji genu w mięśniach niż same plazmidy DNA. Stwierdzili, że ten sposób terapii jest dobrze tolerowany i powoduje powstanie silnej odpowiedzi przeciwko rosnącym nowotworom, prowadząc do ich remisji oraz chroniąc przed wzrostem podanych następczo komórek.

W ostatnim czasie zastosowano bardzo ciekawe podejście terapeutyczne, w którym gen dla IL-12 podawany był doustnie [83]. Wykorzystano w nim jako nośnik genów żywe, atenuowane bakterie *Salmonella typhimurium*. Po podaniu doustnym, bakterie te mogą penetrować epitelialne komórki M, wnikając do kępek Peyera. Podczas zachodzącej tam fagocytozy bakterii, plazmid zawierający gen dla IL-12 jest uwalniany do cytoplazmy oraz integrowany w jądrze. Może to prowadzić do ekspresji genu dla IL-12 w komórkach takich narządów, jak: wątroba, śledziona, jelito, nerki oraz w nowotworze. Terapia ta pozwoliła zabezpieczyć badane zwierzęta przed wzrostem dwóch różnych linii nowotworowych. Wyniki wskazują, że może być ona prostą, efektywną i bezpieczną strategią w walce z nowotworami.

#### 4. PODSUMOWANIE

Terapia genowa nowotworów przy pomocy genu dla IL-12 okazała się metodą wysoce efektywną na modelu zwierzęcym. Podjęte zostały więc pierwsze próby kliniczne. W 1998 r. ukazały się wyniki I fazy próby klinicznej dotyczącej terapii za pomocą szczepionki z autologicznych komórek czerniaka modyfikowanych genami dla IL-12. Nawet w grupie terminalnie chorych pacjentów szczepionka indukowała mechanizmy immunologiczne, które mogą być interpretowane jako istotne w odpowiedzi przeciwnowotworowej, nie powodując jednocześnie istotnych działań toksycznych [72]. Podobne efekty zaobserwowano w opisanych wcześniej badaniach fazy I, obejmujących zastosowanie modyfikowanych genetycznie fibroblastów zawierających gen dla IL-12 [35]. Aktualnie, planuje się także rozpoczęcie I fazy badań nad doguzowym podawaniem genu dla IL-12 u pacjentów ze spontanicznymi przerzutami nowotworowymi do skóry. Dzięki licznym strategiom mającym na celu wzmoczenie skuteczności tego kierunku terapii genowej można oczekiwać, że zwiększy ona skuteczność leczenia wielu nowotworów u człowieka.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] ADDISON CL, BRAMSON JL, HITT MM, MULLER WJ, GAULDIE J, GRAHAM FL. Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors. *Gene Ther* 1998; 5:1400-1409
- [2] ADRIS S, CHULUYAN E, BRAVO A, BERENSTEIN M, KLEIN S, JASNIS M, CARBONE C, CHERNAJOVSKY Y, PODHAJECER OL. Mice vaccination with Interleukin 12-transduced colon cancer cells potentiates rejection of syngeneic non-organ-related tumor cells. *Cancer Res* 2000; 60: 6696-6703.
- [3] AKIYAMA Y, WATANABE M., MURUYAMA K, RUSCETTI FW, WILTROUT RH, YAMAGUCHI K. Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Ther* 2000; 7: 2113-2121.
- [4] ARUGA A, ARUGA E, CHANG A. Reduced efficacy of allogeneic versus syngeneic fibroblasts modified to secrete cytokines as a tumor vaccine adjuvant. *Cancer Res* 1997; 57: 3230-3237.

- [5] ARUGA A, TANIGAWA K, ARUGA E, YU H, CHANG AE. Enhanced adjuvant effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-12 compared with either alone in vaccine-induced tumor immunity. *Cancer Gene Ther* 1999; **6**: 89–95.
- [6] ARUGA E, ARUGA A, ARCA MJ, LEE WMF, YANG N-S, SMITH JW, CHANG AE. Immune responsiveness to a murine mammary carcinoma modified to express B7-1, interleukin-12, or GM-CSF. *Cancer Gene Ther* 1997; **4**: 157–166.
- [7] ATKINS MB, ROBERTSON MJ, GORDON M, LOTZE MT, DECOSTE M, DUBOIS JS, RITZ J, SANDLER AB, EDINGTON HD, GARZONE PD, MIER JW, CANNING CM, BATTIATO L, TAHARA H, SHERMAN ML. Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 409–417.
- [8] BENNETT JJ, MALHOTRA S, WONG RJ, DELMAN K, ZAGER J, ST-LOUIS M, JOHNSON P, FONG Y. Interleukin 12 secretion enhances antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for colorectal cancer. *Ann Surg* 2001; **233**: 819–826.
- [9] BHARDWAJ N, SEDER RA, REDDY A, FELDMAN MV. IL-12 in conjunction with dendritic cells enhances antiviral CD8+ CTL responses *in vitro*. *J Clin Invest* 1996; **98**: 715–722.
- [10] BRUNDA MJ, LUISTRO L, WARRIER RR, WRIGHT RB, HUBBARD BR, MURPHY M., WOLF SF, GATELY MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin-12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993; **178**: 1223–1230.
- [11] BUBENIK J, VOITENOK NN, KIELER J, PRASSOLOV VS, CHUMAKOV PM, BUBENIKOVA D, SIMOVA J, JANDLOVA T. Local administration of cells containing an inserted IL-2 gene and producing IL-2 inhibits growth of human tumours in nu/nu mice. *Immunol Lett* 1988; **19**: 279–282.
- [12] BUDRYK M, WILCZYŃSKA U, SZARY J, SZALA J. Direct transfer of IL-12 gene into growing Renca tumors. *Acta Biochim Pol* 2000; **47**: 385–391.
- [13] CARR-BRENDEL V, MARKOVIC D, SMITH M, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, COHEN EP. Immunity to breast cancer in mice immunized with X-irradiated breast cancer cells modified to secrete IL-12. *J Immunother* 1999; **22**: 415–422.
- [14] CAROLL MW, OVERVIJK WW, SURMAN DR, TSUNG K, MOSS B, RESTIFO N. Construction and characterization of a triple-recombinant vaccinia virus encoding B7-1, interleukin 12, and a model tumor antigen. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1881–1887.
- [15] CARUSO M, PHAM-NGUYEN K, KWONG Y, XU B, KOSAI K, FINEGOLD M, WOO SLC, CHEN S. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 11302–11306.
- [16] CAVALLO F, DI CARLO E, BUTERA M, VERRUA R, COLOMBO MP, MUSIANI P, FORNI G. Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12. *Cancer Res* 1999; **59**: 414–421.
- [17] CAVALLO F, SIGNORELLI P, GIOVARELLI M, MUSIANI P, MODESTI A, BRUNDA MJ, COLOMBO MP, FORNI G. Antitumor efficacy of adenocarcinoma cells engineered to produce interleukin 12 (IL-12) or other cytokines compared with exogenous IL-12. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**: 1049–1058.
- [18] CHEN Y, EMTAGE P, ZHU Q, FOLEY R, MULLER W, HITT M, GAULDIE J, WAN Y. Induction of ErbB-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. *Gene Ther* 2001; **8**: 316–323.
- [19] COLOMBO MP, VAGLIANI M, SPREAFICO F, PARENZA M, CHIODONI C, MELANI C, STOPPACCIARO. Amount of interleukin-12 available at the tumor site is crucial for tumor regression. *Cancer Res* 1996; **56**: 2531–2534.
- [20] COUGHLIN CM, SALHANY KE, WYSOCKA M, ARUGA E, KURZAWA H, CHANG AE, HUNTER CA, FOX JC, TRINCHIERI G, LEE WMF. Interleukin-12 and Interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1441–1452.
- [21] DI CARLO E, COMES A, BASSO S, DE AMBROSSIA A, MEAZZA R, MUSIANI P, MOELLING K, ALBINI A, FERRINI S. The combined action of IL-15 and IL-12 gene transfer can induce tumor cell rejection without T and NK cell involvement. *J Immunol* 2000; **165**: 3111–3118.
- [22] DUNUSSI-JOANNOPOULOS K, RUNYON K, ERICKSON K, SCHAUB RG, HAWLEY RG, LEONARD JP. Vaccines with interleukin-12-transduced acute myeloid leukemia cells elicit very potent therapeutic and long-lasting protective immunity. *Blood* 1999; **4**: 4263–4273.
- [23] EGILMEZ NK, JONG YS, SABEL MS, JACOB JS, MATHIOWITZ E, BANKERT RB. *In situ* tumor vaccination with interleukin-12-encapsulated biodegradable microspheres: Induction of tumor regression and potent antitumor immunity. *Cancer Res* 2000; **60**: 3832–3837.
- [24] FORNI G, FUJIWARA H, MARTINO F, HAMAOKA T, JEMMA C, CARETTO P, GIOVARELLI M. Helper strategy in tumor immunology: expansion of helper lymphocytes and utilization of helper lymphokines for experimental and clinical immunotherapy. *Cancer Metast Rev* 1988; **7**: 289–309.



- [25] FUJI N, FUJIWARA H, UEDA Y, TANIGUCHI F, YOSHIMURA T, OKA T, YAMAGISHI H. Augmentation of local antitumor immunity in the liver by tumor vaccine modified to secrete murine IL-12. *Gene Ther* 1999; **6**: 1120–1127.
- [26] FUJIWARA H, YAMAUCHI N, SATO Y, SASAKI K, TAKAHASHI M, OKAMOTO T, SATO T, IYAMA S, KOSHITA Y, HIRAYAMA M, YAMAGISHI H, NIITSU Y. Synergistic suppressive effect of double transfection of Tumor Necrosis Factor-alpha and interleukin 12 genes on tumorigenicity of Meth-A cells. *Jpn J Cancer Res* 2000; **91**: 1296–1302.
- [27] FURUMOTO K, SHIGEKI A, YAMASAKI S, MIZUMOTO M, MORI A, INOUE N, ISOBE N, IMA-MURA M. Spleen-derived dendritic cells engineered to enhance interleukin-12 production elicit therapeutic antitumor immune responses. *Int J Cancer* 2000; **87**: 665–672.
- [28] GAUTAM SC, XU YX, DUMAGUIN M, JANAKIRAMAN N, CHAPMAN RA. Interleukin-12 (IL-12) gene therapy of leukemia: immune and anti-leukemic effects of IL-12-transduced hematopoietic progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 1060–1068.
- [29] GOŁĄB J, ZAGOŹDŻON R. Antitumor effects of interleukin-12 in pre-clinical and early clinical studies (Review). *Internat J Molec Med* 1999; **3**: 537–544.
- [30] GOMEZ-NAVARRO J, CUIEL DT, DOUGLAS JT. Gene therapy of cancer. *Eur J Cancer* 1999; **35**: 867–885.
- [31] HALLEZ S, DETREMMERIE O, GIANNOULI C, THIELEMANS K, GAJEWSKI TF, BURNY A, LEO O. Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16-transformed cells provide a potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity. *Int J Cancer* 1999; **81**: 428–437.
- [32] HANNA E, ZHANG X, WOODLIS J, BREAU R, SUEN J, LI S. Intramuscular electroporation delivery of IL-12 gene for treatment of squamous cell carcinoma located at distant site. *Cancer Gene Ther* 2001; **8**: 151–157.
- [33] HEINZERLING LM, FEIGE K, RIEDER S, AKENS M, DUMMER R, STRANZINGER G, MOELLING K. Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses. *J Mol Med* 2001; **78**: 692–702.
- [34] HULL GW, MCCURDY MA, NASU Y, BANGMA CH, YANG G, SHIMURA S, LEE HM, WANG J, ALBANI J, EBARA S, SATO T, TIMME TL, THOMPSON TC. Prostate cancer gene therapy: comparison of adenovirus-mediated expression of interleukin 12 with interleukin 12 plus B7-1 for in situ gene therapy and gene-modified, cell-based vaccines. *Clinical Cancer Res* 2000; **6**: 4101–4109.
- [35] KANG WK, PARK C, YOON HL, KIM WS, YOON SS, LEE MH, PARK K, KIM K, JEONG HS, KIM JA, NAM SJ, YANG JH, SON YI, BAEK CH, HAN J, REE HJ, LEE ES, KIM SH, KIM DW, AHN YC, HUH SJ, CHOE YH, LEE JH, PARK MH, KONG GS, PARK EY, KANG YK, BANG YJ, PAIK NS, LEE SN, KIM SH, KIM S, ROBBINS PD, TAHARA H, LOTZE MT, PARK CH. Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 671–684.
- [36] KASAOKA Y, NAKAMOTO T, WANG J, USUI T, HAMADA H. Gene therapy for murine renal cell carcinoma using genetically engineered tumor cells to secrete interleukin-12. *Hiroshima J Med Sci* 2000; **49**: 29–35.
- [37] KAWIAK J, HOSER G. Niektóre mechanizmy immunologiczne w nowotworach. Immunoterapia nowotworów w modelach zwierzęcych oraz w klinice. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 91–118.
- [38] KURZAWA H, WYSOCKA M, ARUGA E, CHANG AE, TRINCHIERI G, LEE WMF. Interleukin 12 enhances cellular immune responses to vaccination only after a period of suppression. *Cancer Res* 1998; **58**: 491–499.
- [39] LASEK W, FELESZKO W, GOŁĄB J, STOKŁOSA T, MARCZAK M, DĄBROWSKA A, MALEJCZYK M, JAKÓBISIAK M. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor in mice. *Cancer Immunol Immun* 1997; **45**: 100–108.
- [40] LASEK W, GOŁĄB J, MAŚLIŃSKI W, ŚWITAJ T, BAŁKOWIEC EZ, STOKŁOSA T, GIERMASZ A, MALEJCZYK M, JAKÓBISIAK M. Subtherapeutic doses of interleukin-15 augment the anti-tumor effect of interleukin-12 in a B16F10 melanoma model in mice. *Eur Cytokine Netw* 1999; **10**: 345–356.
- [41] LODE HN, XIANG R, DUNCAN SR, THEOFILOPOULOS AN, GILLIES SD, REISFELD RA. Tumor-targeted IL-2 amplifies T cell-mediated immune response induced by gene therapy with single-chain IL-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8591–8596.
- [42] MARTINET O, ERMEKOVA V, QIAO JQ, SAUNTER B, MANDELI J, CHEN L, CHEN S-H. Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 931–936.
- [43] MATSUMOTO G, SUNAMURA M, SHIMAMURA H, KODAMA T, HASHIMOTO W, KOBARI M, KATO K, TAKEDA K, YAGITA H, OKUMURA K, HAMADA H, MATSUNO S. Adjuvant immunotherapy using fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 prevents recurrence after surgical resection of established tumors in a murine adenocarcinoma model. *Surgery* 1999; **125**: 257–264.

- [44] MAZZOLINI G, QIAN C, NARVAIZA I, BARAJAS M, BORRAS-CUESTA F, XIE X, DUARTE M., MELERO I, PRIETO J. Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergises with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 113–125.
- [45] MEKO JB, YIM JH, TSUNG K, NORTON JA. High cytokine production and effective antitumor activity of a recombinant vaccinia virus encoding murine interleukin 12. *Cancer Res* 1995; **55**: 4765–4770.
- [46] MELERO I, DUARTE M., RUIZ J, SANGRO B, GALOFRE JC, MAZZOLINI G, BUSTOS M., QIAN C, PRIETO J. Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of established murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Ther* 1999; **6**: 1779–1784.
- [47] MELERO I, MAZZOLINI G, NARVAIZA I, QIAN C, CHEN L, PRIETO J. IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies. *TRENDS in Immunology* 2001; **22**: 113–115.
- [48] MENDIRATTA SK, QUEZADA A, MATAR M, WANG J, HEBEL HL, LONG S, NORDSTROM JL, PERICLE F. Intratumoral delivery of IL-12 gene by polyvinyl polymeric vector system to murine renal and colon carcinoma results in potent antitumor immunity. *Gene Ther* 1999; **6**: 833–839.
- [49] MOUNTAIN A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 2000; **18**: 119–128.
- [50] NAGAI H, HARA I, HORIKAWA T, FUJII M, KURIMOTO M, KAMIDONO S, ICHIHASHI M. Antitumor effects on mouse melanoma elicited by local secretion of Interleukin-12 and their enhancement by treatment with Interleukin-18. *Cancer Invest* 2000; **18**: 206–213.
- [51] NANDAKUMAR KS, LAKSHMI RAO K, PARDHASARADHI BV, KHAR A. Upregulation of antitumor immunity by IL-12 gene-transfected AK-5 tumor cells in vivo. *Cytokines Cell Mol Therap* 1995; **5**: 7–14.
- [52] NANNI P, ROSSI I, GIOVANNI C, LANDUZZI L, NICOLETTI G, STOPPACIARO A, PARENZA M, COLOMBO MP, LOLLINI PL. Interleukin 12 gene therapy of MHC-negative murine melanoma metastases. *Cancer Res* 1998; **58**: 1225–1230.
- [53] NARVAIZA I, MAZZOLINI G, BARAJAS M, DUARTE M, ZARATIEGUI M, QIAN C, MELERO I, PRIETO J. Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-g-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy. *J Immunol* 2000; **164**: 3112–3122.
- [54] NASU Y, BANGMA CH, HULL GW, LEE H-M, HU J, WANG J, MCCURDY MA, SHIMURA S, YANG G, TIMME TL, THOMPSON TC. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer: suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model. *Gene Ther* 1999; **6**: 338–349.
- [55] NISHIOKA Y, HIRAO M., ROBBINS PD, LOTZE MT, TAHARA H. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res* 1999; **59**: 4035–4041.
- [56] OSHIKAWA K, RAKHMILEVICH AL, SHI F, SONDEL PM, YANG N-S, MAHVI DM. Interleukin 12 gene transfer into skin distant from the tumor site elicits antimetastatic effects equivalent to local gene delivery. *Human Gene Ther* 2001; **12**: 149–160.
- [57] PALMER K, HITT M, EMTAGE PCR, GYORFFY S, GAULDIE J. Combined CXC chemokine and interleukin-12 gene transfer enhances antitumor immunity. *Gene Ther* 2001; **8**: 282–290.
- [58] POPOVIC D, EL-SHAMI KM, VADAI E, FELDMAN M, TZEHOVAL E, EISENBACH L. Antimetastatic vaccination against Lewis lung carcinoma with autologous tumor cells modified to express murine interleukin 12. *Clin Exp Metastas* 1998; **16**: 623–632.
- [59] RAKHMILEVICH AL, JANSSEN K, HAO Z, SONDEL PM, YANG N-S. Interleukin-12 gene therapy of a weakly immunogenic mouse mammary carcinoma results in reduction of spontaneous lung metastases via a T-cell-independent mechanism. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 826–838.
- [60] RAKHMILEVICH AL, TIMMINS JG, JANSSEN K, POHLMANN EL, SHEEHY MJ, YANG N-S. Gene gun-mediated IL-12 gene therapy induces antitumor effects in the absence of toxicity: a direct comparison with systemic IL-12 protein therapy. *J Immunother* 1999; **22**: 135–144.
- [61] RAKHMILEVICH AL, TURNER J, FORD MJ, MCCABE D, SUN WH, SONDEL PM, GROTA K, YANG N-S. Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6291–6296.
- [62] ROBERTSON MJ, CAMERON C, ATKINS MB, GORDON MS, LOTZE MT, SHERMAN ML, RITZ J. Immunological effects of interleukin 12 administered by bolus intravenous injection to patients with cancer. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 9–16.
- [63] RODOLFO M, MELANI C, ZILOCCHI C, CAPETTI B, LUISON E, ARIOLI I, PARENZA M, CANEVARI S, COLOMBO MP. IgG2a induced by interleukin (IL) 12-producing tumor cell vaccines but not IgG1 induced by IL-4 vaccine is associated with the eradication of experimental metastases. *Cancer Res* 1998; **58**: 5812–5817.



- [64] RODOLFO M, ZILOCCHI C, CAPETTI B, PARMIANI G, MELANI C, COLOMBO MP. Cytotoxic T lymphocyte response against non-immunoselected tumor antigens predicts the outcome of gene therapy with IL-12-transduced tumor cell vaccine. *Gene Ther* 1999; 6: 865–872.
- [65] RODOLFO M, ZILOCCHI C, MELANI C, CAPETTI B, ARIOLI I, PARMIANI G, COLOMBO MP. Immunotherapy of experimental metastases by vaccination with interleukin gene-transduced adenocarcinoma cells sharing tumor-associated antigens. Comparison between IL-12 and IL-2 gene transduced tumor cell vaccines. *J Immunol* 1996; 157: 5536–5542.
- [66] SANCHES R, KUIPER M, PENAULT-LORCA F, AUNOBLE B, D'INCAN C, BIGNON Y-J. Antitumoral effect of interleukin-12-secreting fibroblasts in a mouse model of ovarian cancer: Implications for the use of ovarian cancer biopsy-derived fibroblasts as a vehicle for regional gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 707–720.
- [67] SCHMITT M, IKEDA H, NAGATA Y, GU X, WANG L, KURIBAYASHI K, SHIKU H. Involvement of T-cell subsets and Natural Killer (NK) cells in the growth suppression of murine fibrosarcoma cells transfected with Interleukin-12 (IL-12) genes. *Int J Cancer* 1997; 72: 505–511.
- [68] SCHULTZ J, HEINZERLING L, PAVLOVIC J, MOELLING K. Induction of long-lasting cytokine effect by injection of IL-12 encoding plasmid DNA. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 1557–1565.
- [69] SHIMIZU T, BERHANU A, REDLINGER RE JR, WATKINS S, LOTZE MT, BARKSDALE EM JR. Interleukin-12 transduced dendritic cells induce regression of established murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 1285–1292.
- [70] SIDERS WM, WRIGHT PW, HIXON JA, ALVORD WG, BACK T C, WILTROUT RH, FENTON RG. T cell- and NK cell-independent inhibition of hepatic metastases by systemic administration of an IL-12-expressing recombinant adenovirus. *J Immunol* 1998; 160: 5465–5474.
- [71] SONG K, CHANG Y, PRUD'HOME GJ. IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune-gene knockout mice. *Gene Ther* 2000; 7: 1527–1535.
- [72] SUN Y, JURGOVSKY K, MOLLER P, ALIJAGIC S, DORBIC T, GEORGIEVA J, WITTIG B, SCHAENDORF D. Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 1998; 5: 481–490.
- [73] TAHARA H, ZEH III HJ, STORKUS WJ, PAPPO I, WATKINS S, GUBLER U, WOLF SF, ROBBINS PD, LOTZE MT. Fibroblasts genetically engineered to secrete IL-12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma *in vivo*. *Cancer Res* 1994; 54: 182–189.
- [74] TAKADA T, KATO K, YAGITA H, HAMADA H, OKOMURA K. Effects of immunisation with tumor cells double transfected with interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes on artificial metastasis of colon26 cells in BALB/c mice. *Clin Exp Metastas* 1999; 17: 125–130.
- [75] TAN J, NEWTON CA, DJEU JY, GUTSCH DE, CHANG AE, YANG N-S, KLEIN TW. Injection of complementary DNA encoding IL-12 inhibits tumor establishment at a distant site in a murine renal carcinoma model. *Cancer Res* 1996; 56: 3399–3403.
- [76] TANAKA M, SAIJO Y, SATO G, SUZUKI T, TAZAWA R, SATOH K, NUKIWA T. Induction of antitumor immunity by combined immunogene therapy using IL-2 and IL-12 in low antigenic Lewis lung carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 1481–1490.
- [77] TANNEBAUM CS, TUBBS R, ARMSTRONG D, FINKE JH, BUKOWSKI RM, HAMILTON TA. The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12 mediated regression of mouse Renca tumor. *J Immunol* 1998; 161: 927–932.
- [78] TRINCHIERI G. Interleukin 12: A cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 1998; 70: 83–243.
- [79] TUTING T, WILSON CC, MARTIN DM, KASAMON YL, ROWLES J, MA DI, SLINGLUFF CL JR, WAGNER SN, VAN DER BRUGGEN P, BAAR J, LOTZE MT, STORKUS WJ. Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses *in vitro*: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha. *J Immunol* 1998; 160: 1139–1147.
- [80] WOLFF JA, LUDTKE JJ, ACSADI G, WILLIAMS P, JANI A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 363–369.
- [81] WOLFF JA, MALONE RW, WILLIAMS P, CHONG W, ACSADI G, JANI A, FELGNER PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465–1468.
- [82] YANG J-P, HUANG L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Ther* 1996; 3: 542–548.
- [83] YUHUA L, KUNYUAN G, HUI C, YONGMEI X, CHAOYANG S, XUN T, DAMING R. Oral cytokine gene therapy against murine tumor using attenuated *Salmonella typhimurium*. *Int J Cancer* 2001; 94: 438–443.
- [84] ZILOCCHI C, STOPPACIARO A, CHIODONI C, PARENZA M, TERRAZZINI N, COLOMBO MP. Interferon g-independent rejection of interleukin 12-transduced carcinoma cells requires CD4+ T cells and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Exp Med* 1998; 188: 133–143.

- [85] ZITVOGEL L, TAHARA H, ROBBINS PD, STORKUS WJ, CLARKE MR, NALESNIK MA, LOTZE MT. Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. *J Immunol* 1995; **155**: 1393–1403.
- [86] ZITVOGEL L, ROBBINS PD, STORKUS WJ, CLARKE MR, MAEURER MJ, CAMPBELL RL, DAVIS CG, TAHARA H, SCHREIBER RD, LOTZE MT. Interleukin-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumors. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 1335–1341.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 14.02.2002 r.*

*Przyjęto: 06.03.2002 r.*

*Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa*

*e-mail: gbasak@ib.amwaw.edu.pl*



## ROLA BIAŁEK Z RODZINY Rel/NFκB/IκB W PATOGENEZIE NOWOTWORÓW

### THE ROLE OF Rel/NFκB/IκB PROTEINS IN THE PATHOGENESIS OF CANCER

Andrzej DEPTAŁA<sup>1</sup>, Daria NURZYŃSKA<sup>1</sup>, Zbigniew DARŻYŃKIEWICZ<sup>2</sup>,  
Wiesław Wiktor JĘDRZEJCZAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM,  
Warszawa.

<sup>2</sup> Brander Cancer Research Institute, New York Medical College, Hawthorne, NY.

**Streszczenie:** Rodzina białek transkrypcyjnych Rel/ NFκB/IκB pełni ważną rolę w regulacji szeregu procesów związanych z odpowiedzią immunologiczną i zapalną oraz w kontroli wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych. W prezentowanej pracy poglądowej przedstawiono budowę białek Rel/NFκB/IκB, mechanizmy ich działania, znaczenie fizjologiczne oraz omówiono ich rolę w patogenezie nowotworów indukowanych retrowirusami i w rozwoju innych ludzkich nowotworów, głównie białaczek i chłoniaków. Przedstawiono też metody przeciwdziałania zaburzeniom aktywności białek tej rodziny prowadzących do nowotworzenia.

**Słowa kluczowe:** czynniki transkrypcyjne, Rel/NFκB, białka IκB, transformacja nowotworowa.

**Summary:** The family of transcription factors Rel/NFκB/IκB plays a pivotal role in the regulation of a wide spectrum of immune and inflammatory responses as well as normal and malignant cellular growth control. In this review, we present current knowledge of the structure, mechanisms of action, biological function and the role of Rel/NFκB/IκB proteins in the pathogenesis of retroviral-induced cancers and other human cancers, mainly leukemias and lymphomas. Subsequently, different methods of counteracting the disturbances in their function associated with malignant transformation are discussed.

**Key words:** Rel/NFκB, transcription factors, IκB proteins, malignant transformation.

**Wykaz skrótów:** ASFV (*African swine fever virus*) – wirus afrykańskiej gorączki u świń, ATL (*Adult T-cell leukemia/lymphoma*) – białaczka/chłoniak z kom. B dorosłych, DLLC (*diffuse large lymphomas cell*) – rozlany chłoniak z dużych komórek, EBV – wirus Epsteina-Barr, EBNA (*Epstein-Barr nuclear antigen 1*) – antygen jądrowy wirusa EBV, G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów, GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów i makrofagów, HBV – wirus zapalenia wątroby typu B, HTLV-I (*Human T-cell lymphotropic virus 1*) – ludzki wirus T-limfocytotropowy, ICAM

(*intercellular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej, **IKK** (*IκBα kinase*) – kinaza białka IκBα, **IL** – interleukina, **IL-2R** – receptor dla interleukiny 2, **INF** – interferon, **LMP-1** (*latent membrane protein 1*) – powolne białko błonowe 1, **LPS** – lipopolisacharydy, **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej, **NF-ATp** (*preformed nuclear factor of activated T-cells*) – preformowany czynnik transkrypcyjny aktywowanych limfocytów T, **NLS** (*nuclear translocation signal*) – sekwencja odpowiedzialna za translokację do jądra komórkowego, **PBL-B** – przewlekła białaczka limfatyczna z kom. B, **RHD** (*Rel Homology Domain*) – homologiczna sekwencja rodziny białek Rel, **TA** (*transcription activation domain*) – sekwencja odpowiedzialna za aktywację transkrypcji, **TGF** (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu, **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów, **TRAF** (*TNF - Tumor necrosis factor - Receptor Associated Factor*) – czynnik związany z receptorem dla TNF, **u-PA** – aktywator plazminogenu typu urokinazy, **VCAM** (*vascular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń.

## WSTĘP

Zdolność do przetrwania w przyrodzie wymaga od wszystkich istot żywych umiejętności dynamicznego reagowania na stale zmieniające się warunki otoczenia. Organizmy eukariotyczne rozwinęły w toku ewolucji złożone mechanizmy odpowiedzi obronnej na stres, uszkodzenia mechaniczne i zakażenia różnymi patogenami. Na poziomie genetycznym odpowiedź ta polega na kontrolowanej przez różne czynniki transkrypcyjne indukcji ekspresji genów specyficznych dla danego czynnika pobudzającego.

Do najważniejszych z tych czynników obecnych w komórkach eukariota, które biorą udział w regulacji procesów związanych z natychmiastową odpowiedzią immunologiczną i zapalną, zalicza się rodzinę białek Rel/NFκB/IκB. Prowadzone badania, szczególnie intensywnie od roku 1986, w znacznym stopniu wyjaśniły molekularne mechanizmy, za pomocą których białka te regulują wymienione procesy [1]. Oprócz wpływu na procesy odpornościowe i zapalne, białka Rel/NFκB/IκB zaangażowane są w modulowanie proliferacji oraz umierania komórek prawidłowych i nowotworowych. Jednakże rola tych białek w tym zakresie jest jeszcze niedostatecznie poznana. Artykuł ten ma za zadanie przybliżyć aktualny stan wiedzy na temat budowy i funkcji białek z rodziny Rel/NFκB/IκB oraz ich roli w patogenezie nowotworów.

## BUDOWA I FUNKCJA BIOLOGICZNA BIAŁEK Rel/NFκB/IκB

Nazwa tych białek wywodzi się od odkrycia dwójki badaczy, Sen i Baltimore, którzy w 1986 r. po raz pierwszy opisali czynnik jądrowy (*nuclear factor* – NF), wiążący się z promotorem genu dla łańcucha kappa immunoglobulin w limfocytach B (κB). W wyniku intensywnych badań prowadzonych w ostatnich kilkunastu latach poznano u



ssaków dziesięć czynników, które zaliczono do wspólnej rodziny białek transkrypcyjnych typu NFκB. Wśród tych białek pięć pełni rolę regulatorów (Rel/NFκB) procesów transkrypcyjnych, a drugie pięć ma właściwości inhibitorowe (IκB). Są to odpowiednio: p50/p105 (określany także jako NFκB1), p52/p100 (czyli NFκB2), c-Rel (Rel), RelA (p65) i RelB oraz IκBa, IκBb, IκBg (p105), IκBd (p100) i Bcl-3. Do tej rodziny dołączono odkryte ostatnio dwa inne białka, o nieznanym dostatecznie funkcji, które nazwano IκBe i IκBR [1, 2, 34].

Każde z białek Rel/NFκB zawiera homologiczną domenę RHD (*Rel Homology Domain*), zbudowaną z ok. 300 aminokwasów, znajdującą się w N-końcowym odcinku łańcucha peptydowego. RHD jest odpowiedzialna za tworzenie dimerów, umożliwianie wnikania do jądra komórkowego i przyłączanie się cząsteczki do odpowiedniej sekwencji DNA. W końcowym odcinku RHD zlokalizowana jest sekwencja określana ze względu na swoją funkcję jako NLS (*nuclear location signal*), będąca miejscem przyłączenia białka IκB w jądrze komórkowym [2, 27].

Podrodzinę białek Rel/NFκB można podzielić na 2 klasy, różniące się sekwencjami w odcinku C-końcowym. Białka pierwszej klasy, do której należą p50/p105 i p52/p100, są syntetyzowane jako białka prekursorowe (p105 i p100). Charakterystyczną cechą budowy tworzącego je łańcucha aminokwasowego jest istnienie wielu powtórzeń ankirynowych w odcinku C-końcowym. W wyniku proteolizy tych odcinków powstają formy ostateczne (odpowiednio p50, p52), które zachowują fragment RHD i mają zdolność do łączenia się z DNA. Białka należące do drugiej klasy, tzn. c-Rel, RelA (p65), RelB, nie ulegają pierwotnej obróbce proteolitycznej, a w ich C-końcowym odcinku znajduje się sekwencja odpowiedzialna za aktywację transkrypcji cząsteczki DNA (TA, *transcription activation domain*) [2, 9, 16, 17].

Białka obydwu tych podklas łączą się w dimery, stając się aktywnymi czynnikami regulującymi transkrypcję odpowiednich odcinków DNA. W warunkach fizjologicznych funkcję tę spełniają heterodimery. Heterodimery różniące się podjednostkami, nawet podobnymi strukturalnie (np. p50/p65 i p52/p65), mogą wywierać różny efekt biologiczny poprzez regulowanie ekspresji genów w odmienny sposób (np. poprzez wiązanie się z różnymi fragmentami promotorowymi) bądź też aktywowanie różnych genów (np. p50/p65 aktywuje gen receptora interleukiny 2 – IL-2R, podczas gdy p52/p65 nie ma takiej aktywności, mimo że może wiązać się z promotorem genu IL-2R). Różna jest ponadto kinetyka procesów związanych z translokacją różnych heterodimerów do jądra komórkowego (np. p50/p65 przenika do jego wnętrza znacznie szybciej niż p50/c-Rel, którego szczytowe stężenie w jądrze komórkowym obserwowane jest dopiero po kilku godzinach od zadziałania bodźca), co może mieć istotne znaczenie w regulacji transkrypcji genów z udziałem białek rodziny Rel/NFκB. Homodimery (np. p50/p50) na ogół nie mają fizjologicznie funkcji regulatorowych białek transkrypcyjnych, a niektóre z nich mogą pełnić funkcje represorowe [2, 9, 27].

Białka inhibitorowe IκB łączą się z białkami Rel/NFκB i w ten sposób wpływają na ich aktywność. Różne IκB wykazują odmienne powinowactwo do dimerów Rel/NFκB (np. IκBa wiąże się preferencyjnie z kompleksami zawierającymi c-Rel i RelA). Oddziaływania pomiędzy tymi grupami poznano najlepiej na przykładzie NFκB (czyli

p50/p65) i I $\kappa$ B $\alpha$ . W utworzonym kompleksie I $\kappa$ B $\alpha$  blokuje sekwencję NLS i zatrzymuje aktywne dimery p50/p65 w cytoplazmie, tworząc w ten sposób ich pulę rezerwową oraz hamuje wiązanie NF $\kappa$ B z DNA w obrębie jądra komórkowego (poprzez interakcję z sekwencją RHD odpowiedzialną za łączenie z DNA), nie dopuszczając do zainicjowania transkrypcji [28]. Wszystkie I $\kappa$ B zawierają również kopie ankirynowe, które są niezbędne dla interakcji z fragmentami NLS w obrębie RHD białek Rel/NF $\kappa$ B [27, 31, 34].

Białka p105 i p100 również mają zdolność wiązania podjednostek Rel w cytoplazmie i blokowania ich translokacji i interakcji z DNA, dlatego część badaczy zalicza je także do grupy białek I $\kappa$ B (C-końcowy odcinek białka p105 określany jest jako I $\kappa$ B $\beta$ , a białka p100 jako I $\kappa$ B $\delta$ ). Oznacza to, że są one nie tylko białkami prekursorowymi dla regulatorowych czynników transkrypcyjnych, ale mają również funkcje inhibitorowe [2, 34].

Wyjątkiem wśród białek I $\kappa$ B jest Bcl-3, które choć jest zaliczane do tej grupy białek ze względu na swą budowę, pełni odrębne funkcje. Przyłączenie Bcl-3 do p50 lub p52 nie tylko nie hamuje ich wejścia do jądra komórkowego, lecz dzięki obecności w cząsteczce Bcl-3 sekwencji TA i zdolności do zmiany konformacji dimerów związanych z DNA, powoduje indukowanie transkrypcji [2, 27].

Dla przejrzystości współczesne nazewnictwo białek Rel/NF $\kappa$ B I $\kappa$ B $\alpha$  opisywanych w tym artykule przedstawiono w tabeli 1.

Najlepiej poznanym i powszechnie występującym w komórkach białkiem z rodziny Rel/NF $\kappa$ B jest heterodimer p50/p65, określany tradycyjnie mianem NF $\kappa$ B [31]. Dlatego w dalszej części artykułu nazwa NF $\kappa$ B będzie stosowana zamiennie z określeniem Rel/NF $\kappa$ B.

Należy jednak zaznaczyć, że obecnie każdy dimer należący do rodziny czynników transkrypcyjnych Rel/NF $\kappa$ B można określić jako NF $\kappa$ B, jeżeli spełnione są następujące warunki:

- białko to jest zbudowane z dwóch wzajemnie oddziałujących ze sobą monomerów,
- białko to ma zdolność wiązania I $\kappa$ B oraz interakcji z DNA.

Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie budowę ważniejszych przedstawicieli wymienionej rodziny białek.

W warunkach fizjologicznych i przy braku pobudzenia komórki kompleksy p50/p65/I $\kappa$ B $\alpha$  znajdują się w cytoplazmie. Po zadziałaniu na komórkę odpowiednich czynników pobudzających (np. TNF $\alpha$ , IL1, LPS, wolne rodniki, mitogeny, niektóre wirusy i bakterie itp.) i aktywacji szeregu przekaźników wewnątrzkomórkowych o właściwościach kinaz (do których należą m.in. kinazy NIK, MEKK-1, RIP i najprawdopodobniej także RAS), dochodzi do fosforylacji reszt serynowych N-końcowego odcinka I $\kappa$ B $\alpha$  przez kinazę białkową (IKK, I $\kappa$ B $\alpha$  kinase) zależną od ubikwityny [2, 14, 29]. Fosforylacja I $\kappa$ B $\alpha$  powoduje przyłączenie ubikwityny do sąsiadujących w cząsteczce reszt lizyny i prowadzi do degradacji I $\kappa$ B $\alpha$  w proteasomach oraz powstania aktywnych heterodimerów NF $\kappa$ B (p50/p65). Następuje odsłonięcie



TABELA 1. Białka z rodziny Rel/NFκB i IκB (zmodyfikowane na podstawie [22])

Białko	Inna nazwa	Gen
NFκB w komórkach ssaków:		
p50 i p105	NFκB1	<i>nfkb1</i>
p52 i p100	NFκB2	<i>nfkb2</i>
RelA	p65	<i>rel a</i>
RelB	I-Rel	<i>rel b</i>
Rel	c-Rel	<i>rel</i>
IκB w komórkach ssaków		
IκBα	MAD-3, pp40, ECI-6	<i>ikb a</i>
IκBβ		<i>ikb</i>
IκBγ	C-końcowy fragment p105	<i>nfkb1</i>
IκBδ	C-końcowy fragment p100	<i>nfkb2</i>
Bcl-3		<i>bcl-3</i>

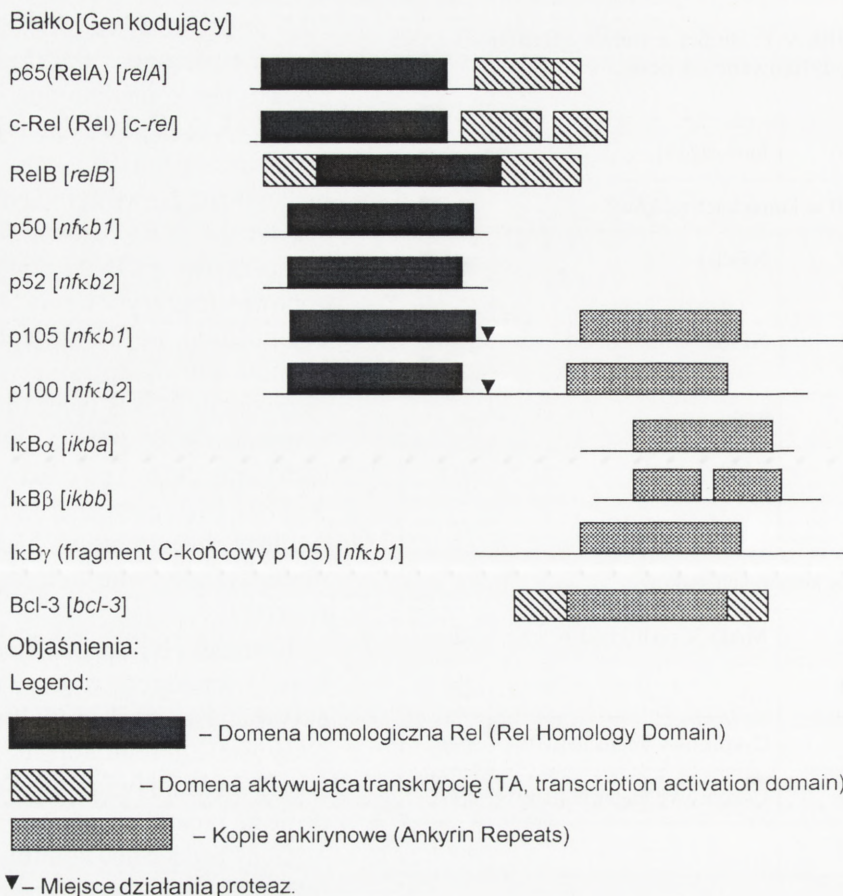
NLS w p50/p65, co powoduje, że aktywne heterodimery NFκB wnikają do jądra komórkowego i inicjują transkrypcję odpowiednich genów, w tym także genu *ikb a*, który koduje białko IκBα. Nowo zsyntetyzowana cząsteczka IκBα usuwa NFκB z kompleksów z DNA, powodując ponowne magazynowanie NFκB w cytoplazmie, aż do następnej aktywacji. Do cytoplazmatycznych magazynów NFκB należą również kompleksy p105/p65 i p100/p65. Z tych kompleksów, po odpowiedniej obróbce enzymatycznej i przetworzeniu w proteasomie, również uwalnianie są aktywne heterodimery NFκB [1, 2, 34].

Kompleks NFκB/IκBβ jest regulowany w podobny sposób, ale jego aktywacja następuje wolniej [2]. Aktywację i regulację działania NFκB przedstawiono schematycznie na rycinie 2.

Geny będące pod kontrolą NFκB (p50/p65) są zaangażowane głównie w procesy odpowiedzi immunologicznej i procesy zapalne.

Są to m.in. geny dla: TNFα, TNFβ, IL-2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IFNβ, IFNγ, TGFβ2, erytropoetyny, MHC I i MHC II, łańcucha lekkiego immunoglobulin κ, łańcucha β receptora limfocytów T, IL-6, IL-8, cząstek adhezyjnych VCAM1 i ICAM1, składnika C4 dopełniacza oraz protoonkogenu c-Myc [7, 14, 16, 21]. NFκB pobudza także syntezę białek Rel, p105 i IκBα, tworząc w ten sposób swoistą pętlę autoregulacyjną, o której była mowa powyżej. Wszystkie z wymienionych genów zawierają miejsca wiązania się z dimerami NFκB, długości około 10 par zasad, zwane κB [27]. Bardziej szczegółowe dane dotyczące budowy, regulacji i roli białek z rodziny Rel/NFκB/IκB w procesach immunologicznych i zapalnych zostały opisane w wielu pozycjach piśmiennictwa [1, 2, 14, 17, 21, 27, 29, 31, 34].

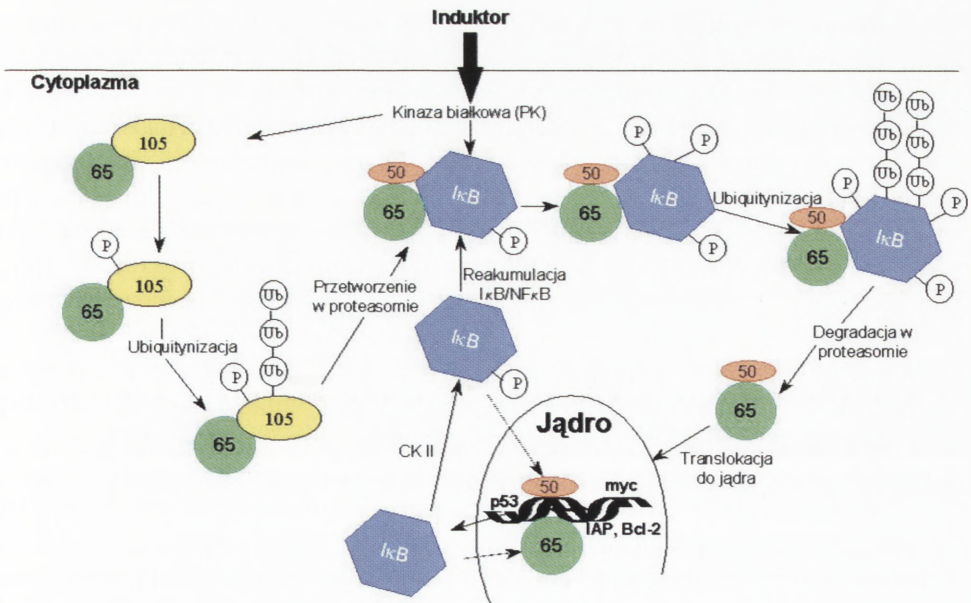
NFκB wydaje się też pełnić rolę głównego modulatora genów kontrolujących wzrost i proliferację komórek zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych [7, 8, 9]. Wbrew powszechnie panującym poglądom, komórki nowotworowe często dzielą się wolniej niż komórki prawidłowe, jednak w odróżnieniu od tych ostatnich czynią to nieprzerwanie, a ponadto często wykazują przedłużony czas życia, co łącznie prowadzi do zwiększania ich liczby. Jednym z głównych czynników odpowiedzialnym za



RYCINA 1. Budowa ludzkich białek z rodziny Rel/NFκB/IκB. Domena RHD odpowiedzialna jest za tworzenie dimerów NFκB (fragment C-końcowy RHD), translokację i wiązanie się białek z odpowiednią sekwencją DNA w obrębie jądra komórkowego oraz przyłączanie cząsteczek inhibitorowych IκB (sekwencja NLS w obrębie C-końcowego fragmentu RHD). Kopie ankirynowe w cząsteczkach IκB są niezbędne dla interakcji z fragmentami NLS w obrębie RHD białek Rel/NFκB.

akumulację komórek nowotworowych wydaje się więc być zahamowanie ich obumierania w procesie apoptozy. Rzeczywiście, wiele nowotworów wykazuje nieprawidłowości genetyczne, które w końcowym efekcie sprzyjają zahamowaniu apoptozy i dysregulacji cyklu komórkowego (inaktywacja genów TP53, RB, Bax, MTS-1, nadmierna aktywacja Bcl-2 itp.) [7, 23]. Wpływ NFκB na wzrost i proliferację komórek wyraża się głównie aktywowaniem genów TP53 i c-myc. NFκB działa antyapoptotycznie poprzez transaktywację genów białek IAP (*IAP* – *inhibitor of apoptosis protein*) oraz współdziałanie z Bcl-2 [6, 7]. Również własne badania dowodzą, że czynnik ten odgrywa kluczową rolę w hamowaniu apoptozy indukowanej chemioterapią [4]. Dlatego zaburzenia ekspresji lub regulacji białek Rel/NFκB/IκB mogą mieć znaczenie w patogenezie nowotworów.





RYCINA 2. Schemat aktywacji i regulacji białek z rodziny Rel/NFκB/IκB. Środek i część prawa: kompleksy p50/p65/IκBα znajdują się w cytoplazmie. Pod wpływem czynników pobudzających dochodzi do fosforylacji IκBα przez kinazę białkową, czego następstwem jest przyłączenie ubikwityny i degradacja IκBα w proteasomach prowadząca do powstania aktywnych heterodimerów NFκB (p50/p65), które wnikają do jądra komórkowego i inicjują transkrypcję genów. Nowo zsyntetyzowana cząsteczką IκBα usuwa NFκB z kompleksów z DNA, powodując ponowne magazynowanie NFκB w cytoplazmie. Część lewa: kompleksy p105/p65 i p100/p65 także stanowią cytoplazmatyczne magazyny NFκB, z których po fosforylacji, ubikwitynacji i przetworzeniu w proteasomie uwalnianie są aktywne heterodimery

W dalszej części artykułu omówiona zostanie rola tych białek w patogenezie nowotworów indukowanych przez wirusy oraz nowotworów niezwiązanych z zakażeniem wirusowym.

## BIĄŁKA Rel I NOWOTWORY INDUKOWANE PRZEZ WIRUSY

Jedynym czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny białek Rel w pełni onkogennym, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, jest v-Rel, onkoproteina kodowana przez ptasiego retrowirusa o nazwie Rev-T. Rev-T wstrzyknięty dootrzewnowo kurczakom indukuje powstawanie chłoniaków o wysokim stopniu złośliwości, które bardzo szybko doprowadzają organizm do śmierci. Wirusy zawierające sekwencje v-Rel mają także zdolność do transformacji nowotworowej *in vitro* m.in. kurzych komórek hematopoetycznych różnych linii (mieloidalnych, limfoidalnych B i T oraz dendrytycznych).

Elementami aktywującymi transkrypcję i transformację nowotworową kurzych komórek są na ogół homodimery v-Rel (jakkolwiek kurze splenocyty mogą być transformowane przez heterodimery p52/v-Rel), które wnikają do jądra komórkowego i wiążą się z DNA. Onkoproteina v-Rel jest skróconym i zmutowanym białkiem kurzym c-Rel. W porównaniu do c-Rel, onkoproteina v-Rel nie zawiera dwóch aminokwasów z końca aminowego i 118 aminokwasów z końca karboksylowego łańcucha. Brak aminokwasów C-końcowych wydaje się być zasadniczą mutacją nadającą v-Rel właściwości transformujące i powodującą stałą ekspresję tego białka w jądrze komórkowym. Transformacja nowotworowa pod wpływem v-Rel może zachodzić poprzez:

- 1) bezpośredni, stały aktywujący wpływ na geny zawierające sekwencje  $\kappa$ B, powodujący przewlekłą stymulację proliferacji (geny dla czynników wzrostu i ich receptorów, np. IL-2 i IL-2R),
- 2) pośredni wpływ wynikający z interakcji z czynnikami zaangażowanymi w ogólną regulację cyklu komórkowego, np. pobudzanie czynnika transkrypcyjnego CBP/p300, koaktywatora m.in. cyklin [8].

Również u myszy homodimery v-Rel wydają się być kluczowymi kompleksami transformującymi limfoblasty (myszy z ekspresją v-Rel, będącego pod kontrolą promotora specyficznego dla limfocytów T, rozwijają chłoniaki T-komórkowe), chociaż na modelu transgenicznym udowodniono, że aktywne w nowotworzeniu mogą być także heterodimery Rel/p50 [8].

U ludzi, białka Rel/NF $\kappa$ B związane są między innymi z transformacyjną rolą ludzkiego retrowirusa limfotropowego T (HTLV-I – *Human T-cell lymphotropic virus I*). Wirus ten wywołuje białaczkę/chłoniaka T komórkowego dorosłych (*Adult T-cell leukemia/lymphoma* – ATL). Zapoczątkowanie przemiany białaczkowej związane jest z funkcją wirusowego genu *tax*. Białko Tax (m. cz. około 40 kDa) zlokalizowane jest w jądrze komórkowym i działa jako aktywator transkrypcji, poprzez modyfikowanie aktywności kilku komórkowych czynników transkrypcyjnych m.in. NF $\kappa$ B [25]. Przypuszczalny model transformacji zależnej od HTLV-I zakłada, że białko Tax nasila degradację I $\kappa$ B $\alpha$  i I $\kappa$ B $\beta$  oraz ułatwia translokację dimerów NF $\kappa$ B do jądra komórkowego, co powoduje stałą aktywację miejsc  $\kappa$ B określonych genów. Badania Hirai dowiodły, że Tax może również inaktywować I $\kappa$ B $\alpha$  w wyniku bezpośredniej interakcji [30]. Ponadto, Tax może przyspieszać proteolizę karboksylowych odcinków prekursorowych białek p105 i p100 w proteasomach, co zwiększa ilość aktywnych dimerów NF $\kappa$ B w jądrze komórkowym [18]. Nadmiar dodatnich sygnałów związanych z nagromadzeniem się w jądrze komórki aktywnych NF $\kappa$ B powoduje zwiększenie produkcji IL-2 i IL-2R, co poprzez auto- i parakrynną stymulację zwiększa proliferację limfocytów T i sprzyja powstawaniu onkogennych białek komórkowych, które przyczyniają się do rozwoju białaczki [8].

Innym onkogennym wirusem u ludzi jest DNA wirus Epsteina-Barr (EBV). Bierze on udział w indukcji szeregu nowotworów, takich jak: chłoniak Burkitta, ziarnica złośliwa i rak nosogardzieli. Większość dowodów z badań *in vitro* przemawia za tym [8], że



białko tego wirusa o nazwie LMP-1 (*latent membrane protein 1*), jest głównym czynnikiem transformującym komórki. Również inne białka tego wirusa mogą mieć podobne właściwości, czego dowodem jest rozwój chłoniaków z komórek B w przypadkach nadmiernej ekspresji białka EBNA1 – (*Epstein-Barr nuclear antigen 1*) u transgenicznnych myszy. LMP-1 to polipeptyd o m. cz. 42 kDa, który indukuje degradację IκBα i przetwarzanie p105, powodując translokację NFκB do jądra komórkowego. Baker i Reddy (1996) uważają, że indukcja aktywności NFκB przez LMP-1 może zachodzić przez białka należące do rodziny TRAF (TNF – *Tumor necrosis factor* – *Receptor Associated Factor*). Agregacja cząsteczek LMP-1 na błonach komórkowych limfocytów B mogłaby powodować gromadzenie TRAF 2 i ciągłą aktywację NFκB, na podobieństwo aktywowania limfocytów B przez cząsteczkę CD40 [10]. Dalsze badania wykazały jednak, że aktywacja NFκB przez LMP-1 i przekazywanie sygnałów przez TRAF może zachodzić także i odrębnymi szlakami. Komórki, na których powierzchni znajduje się LMP-1, cechuje zwiększenie ekspresji genów zawierających sekwencje κB, takich jak: gen dla p53, białka antyapoptotycznego A20 oraz białka adhezyjne CD48. Należy jednak przypuszczać, że dla rozwinięcia się w pełni nowotworowego fenotypu potrzeba kilku różnych mutacji i sama obecność LMP-1 nie jest wystarczająca [8].

Przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) jest związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka pierwotnego wątroby. W tym procesie uczestniczy produkt wirusowego genu X (pX), który jest polipeptydem. Białko pX może aktywować różne, czasami odległe miejsca regulatorowe genów promotorowych, chociaż samo pX nie wiąże się bezpośrednio z DNA. W tych przypadkach pX indukuje degradację IκBα i p105, powodując stałą aktywację NFκB. Ten ostatni, wiążąc się z DNA, powoduje pobudzenie transkrypcji odpowiednich genów. Nie do końca wiadomo, czy w aktywacji NFκB nie pośredniczą inne przekaźniki sygnału, takie jak: Ras, Raf, kinaza białkowa C czy też wolne rodniki tlenowe [8, 21].

Wydaje się więc, że w indukowaniu nowotworów przez wirusy HTLV-I, EBV i HBV zasadniczą rolę odgrywają białka (odpowiednio Tax, LMP-1, pX), które mają zdolność translokacji aktywnego NFκB do jądra komórkowego, co w konsekwencji prowadzi do nieprawidłowej regulacji odpowiednich genów. Również wirus HIV-1 może indukować translokację białek Rel, chociaż nie wywołuje efektu proliferacyjnego. Niewykluczone, że białka Tax, LMP-1 i pX, mogą dodatkowo modyfikować w jakiś szczególnie sposób aktywność kompleksów Rel, co w bardziej bezpośredni sposób wpływa na proliferację komórek.

## **BIAŁKA Rel A NOWOTWORY NIEINDUKOWANE PRZEZ WIRUSY**

Rearanżacje lub amplifikacje genów kodujących Rel lub IκB zachodzą w około 1–10% ludzkich nowotworów wywodzących się z limfocytów T i B. Najczęstszym (i pierwszym spośród opisanych w nowotworach u ludzi) zaburzeniem wśród białek Rel

jest rearanżacja regionu 3' genu *nfkB2* zlokalizowanego u ludzi na chromosomie 10q24 [22]. Rearanżacja ta (obecna w komórkach niezłośliwych chłoniaków B komórkowych, przewlekłej białaczce limfatycznej i szpiczaku mnogim) powoduje delecję sekwencji kodujących kopie ankirynowe na końcach karboksylowych białka, natomiast RHD pozostaje nienaruszona. W ten sposób „skrócone” białko p100 jest stale obecne w jądrze komórkowym, tworzy homodimery i łączy się z DNA w zupełnie inny sposób niż normalne białko p52, powodując aktywację transkrypcji. Najprawdopodobniej dołączenie do p52 jakiegokolwiek sekwencji, innej niż prawidłowe białko p100, może być wystarczające do powstania białka onkogenego.

Z kolei w komórkach Reed-Sternberga i Hodgkina, charakterystycznych dla ziarnicy złośliwej (poza skutkami opisanej w poprzednim podrozdziale infekcji EBV stwierdzanej w około jednej trzeciej przypadków ziarnicy złośliwej) zaobserwowano mutacje w obrębie genów dla  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (znajdujących się na chromosomie 14q13), powodujące powstawanie białek niezdolnych do wiązania się z NF $\kappa$ B [3]. Chociaż w badaniach *in vitro* nie zaobserwowano transformacji fibroblastów pozbawionych obydwu alleli genu *ikba*, to najnowsze badania ludzkich nowotworów często wykazują związek nadmiernej aktywacji NF $\kappa$ B z upośledzoną funkcją  $\text{I}\kappa\text{B}$  [22].

Rearanżacje lub amplifikacje genu *c-rel* na chromosomie 2 w miejscu 2p14–2p15 towarzyszą często transformacji nowotworowej komórek limfoidalnych. Dwie różne grupy badaczy (Brownell 1988 i Mathew 1993) obserwowały obecność 4 lub więcej kopii 2p14-15 w dużych komórkach chłoniaków rozlanych (DLCL – *diffuse large cell lymphoma*) u 23% pacjentów. Tego rodzaju mutacja *c-rel* związana jest ponadto w 75–85% z pozawęzłową postacią DLCL [11,22]. Zwykle amplifikacja genów *c-rel* występowała w tych przypadkach chłoniaków, które miały również nieprawidłowości genetyczne w innych genach jak np. *c-myc* lub *bcl-2* [13]. Z kolei rearanżacja genu *RelA* w ludzkich rozlanych chłoniakach B-komórkowych powoduje obecność w jądrze komórkowym „skróconych” białek aktywujących transkrypcję. Znaczenie tego rodzaju mutacji w onkogenezie potwierdzono w badaniach *in vitro*, przeprowadzonych na fibroblastach zarodków mysich z użyciem fragmentów białek p65, w których zaobserwowano transformację nowotworową komórek oraz w badaniach na modelach zwierzęcych, w których stwierdzono szybki rozwój nowotworów u kur zakażonych retrowirusem Rev powodującym w komórce replikację skróconej wersji genu dla *Rel* [19].

Białko *Bcl-3*, o budowie podobnej do grupy białek  $\text{I}\kappa\text{B}$ , obecne jest w jądrze większości komórek, gdzie pełni funkcje opisane w pierwszej części artykułu. Gen dla tego białka został pierwotnie wykryty w przewlekłej białaczce limfatycznej (PBL) z translokacją t(14;19). Miejsce jego rearanżacji znajduje się na chromosomie 19q13.1, a wspomniana translokacja prowadzi do fuzji z genem dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin. Skutkiem jest zwiększona ekspresja białka *Bcl-3*, prowadząca do powstania nadmiaru aktywnych kompleksów złożonych z homodimerów p52 lub p50 i białka *Bcl-3* oraz nadmiernej aktywacji genów zawierających regulatorowe sekwencje  $\kappa\text{B}$  [20]. Z badań na myszach transgenicznym wynika jednak, że nadmierna ekspresja



Bcl-3 nie jest wystarczająca do transformacji nowotworowej komórek limfoidalnych, a jej wystąpienie wymaga prawdopodobnie współistnienia kilku mutacji i zmian w równowadze pomiędzy białkami wewnątrzkomórkowymi. Podobne wnioski wypływają z badań genetycznych u pacjentów z PBL, u których oprócz zaburzenia aktywności NFκB/Rel stwierdzano także deregulację czynników z rodziny NF-Atp, Octamer, AP-1 [26].

W nielicznych przypadkach stwierdzano nadmierną aktywność p100 i p105 w rakach piersi, jelita grubego i płuc. Nadekspresja *nfk2* obserwowana w raku piersi powodowała zwiększone stężenia p100 i p52 [22]. Skutkiem ich obecności może być pobudzenie genów antyapoptotycznych, na przykład Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> czy *c-myc*. Udział tego ostatniego w rozwoju nowotworu potwierdzają badania, w których nadekspresja genu *c-myc* w komórkach raka piersi u pacjentek, u których nie stwierdzano powiększonych węzłów chłonnych, wiązała się z gorszym rokowaniem [24]. Inni badacze stwierdzili, że aktywacja NFκB w komórkach raka piersi pojawia się, zanim dojdzie do transformacji nowotworowej, co sugeruje jej istotną rolę w progresji do fenotypu nowotworowego [15].

Istnieją także dowody na związek białek z rodziny Rel/NFκB z procesem tworzenia przerzutów odległych. Procesowi temu towarzyszy zwiększona aktywność aktywatora plazminogenu typu urokinazy (u-PA), co znajduje potwierdzenie w badaniach, w których obserwowano nadmierną ekspresję u-PA w komórkach raka trzustki i piersi *in vitro*. Wiadomo także, że stężenie u-PA stanowi czynnik prognostyczny w raku piersi, ponieważ u-PA bierze udział w procesach degradacji błony podstawnej komórek i składników macierzy pozakomórkowej. Badania Wanga przeprowadzone na komórkach raka gruczołowego trzustki udowodniły, że nadekspresja u-PA związana jest bezpośrednio z nadmierną aktywnością RelA [33], która może wynikać z deregulacji kinaz białkowych tworzących łańcuch przekazańników wewnątrzkomórkowych (np. RAS/Raf-1/MEK/ERK)[29]. Wpływ mutacji białek RAS na przekazywanie sygnałów zewnątrzkomórkowych do jądra komórkowego prowadzące do nowotworowej transformacji komórek został omówiony szerzej w innej pracy poglądowej napisanej przez autorów tego artykułu [20].

Badania komórek zawierających onkogenne białka v-Rel, białka wirusa HTLV-I (Tax), czy EBV (LMP-1), a także mutacje genów kodujących białka z rodziny Rel/NFκB/IκB, dostarczają dowodów na udział tych ostatnich w procesie onkogenezy. Wspólną konsekwencją różnych, wymienionych w artykule, mechanizmów zaburzających działanie czynników transkrypcyjnych jest nadmierna proliferacja komórek, a także zahamowanie ich różnicowania oraz obumierania w mechanizmie apoptozy.

## MOŻLIWOŚCI TERAPII NOWOTWORÓW ZWIĄZANE Z MECHANIZMEM DZIAŁANIA Rel/NFκB/IκB

Poznanie roli białek z rodziny Rel/NFκB, mechanizmów ich aktywacji i konsekwencji nadmiernej ekspresji stwarza możliwość nowej terapii nowotworów, w których

powstawaniu udowodniono bezpośredni lub pośredni ich udział. W praktyce wykorzystanie inhibitorów aktywacji NFκB utrudnia fakt złożoności budowy układu Rel/NFκB/IκB (którego elementy stanowią hetero- i homodimery pobudzane przez różne czynniki i pełniące różne funkcje), istnienia wielu mechanizmów regulacyjnych i mnogości czynników działających na komórki za pośrednictwem tej grupy czynników transkrypcyjnych. Znajomość kolejnych etapów pobudzania ekspresji genów za pośrednictwem NFκB pozwala na wyróżnienie inhibitorów:

- 1) kaskady białek przekąźnikowych pobudzanych w odpowiedzi na bodźce zewnętrzno-komórkowe i prowadzących do aktywacji IKK,
- 2) białek biorących bezpośredni udział w regulacji puli cytoplazmatycznej NFκB,
- 3) translokacji NFκB do jądra komórkowego i wiązania się z odpowiednimi sekwencjami DNA.

Pierwszy z wymienionych etapów hamowany jest wysoce niespecyficznie przez powszechnie stosowane leki przeciwzapalne, przede wszystkim kwas acetylosalicylowy i salicylan sodu, które blokują syntezę prostaglandyn stanowiących pierwszy etap odpowiedzi zapalnej na bodźce zewnątrzkomórkowe. Związki te hamują ponadto translokację NFκB do jądra komórkowego poprzez blokowanie fosforylacji i degradacji IκB na skutek bezpośredniego wiązania się z IKKβ i uniemożliwianie jej aktywacji. Z tym mechanizmem związane są także ostatnie doniesienia o próbach stosowania ibuprofenu w celu hamowania wzrostu raka jelita grubego u ludzi i zwiększania wrażliwości komórek raka prostaty na radioterapię. Również glikokortykoidy (deksametazon, prednizon i metylprednizolon) wywierają swoje przeciwzapalne działanie przynajmniej częściowo poprzez hamowanie aktywności NFκB [6].

Ostatni etap przemian prowadzących do translokacji NFκB do jądra komórkowego stanowi degradacja IκB w proteasomach. Najlepiej poznanymi inhibitorami tego procesu są aldehydy peptydowe, hamujące jeden z pięciu enzymów proteolitycznych obecnych w ludzkich proteasomach, chymotrypsynę. Z uwagi na mechanizm działania cechują się jednak wysokim brakiem specyficzności i nie mogą być wykorzystywane w terapii. Blokowanie degradacji IκB osiągnięto także w badaniach *in vitro* pośrednio, poprzez hamowanie ligazy przyłączającej ubikwitynę do cząsteczki białka.

Kurkumina (diferuloylmethane), stanowiąca żółty barwnik curry (*Curcuma longa*), indukuje apoptozę wielu, choć nie wszystkich komórek nowotworowych, na skutek hamowania zdolności NFκB do wiązania się z sekwencją κB w DNA poprzez blokowanie fosforylacji IκB. Komórki nowotworowe, w których występuje zwiększona aktywność NFκB, pozostają odporne na jej działanie, co udowodniono w badaniu z użyciem mysich komórek fibrosarcoma transfekowanych genem *rel a*. Tylko komórki z grupy kontrolnej uległy apoptozie, natomiast w komórkach transfekowanych, wykazujących nadmierną aktywność NFκB, nie stwierdzono kondensacji jądra i fragmentacji DNA pod wpływem kurkuminy. Oporność na kurkuminę wygasła po dodaniu do komórek białka IκB [12].

Wyizolowane pierwotnie z oocytów lub embrionów pewnego gatunku żaby (*Rana pipiens*), a obecnie otrzymywane w drodze syntetycznej białko P-30 ma również



zdolność hamowania aktywności NFκB. Białko to jest rybonukleazą (RNaza) o masie cząsteczkowej 12000 kD i wykazuje homologię z trzustkowymi rybonukleazami. W warunkach doświadczalnych *in vitro*, białko P-30 hamuje wzrost i proliferację eksponencjalnie rosnących różnych linii nowotworowych, jak również hamuje wzrost niektórych guzów u myszy, a jako komercyjnie dostępny preparat o nazwie Onconase weszło do fazy III badań klinicznych u chorych z rakiem trzustki i międzybłoniakiem. Jednym z enzymów, który wydaje się podlegać wpływowi białka P-30, jest kinaza białkowa RNA-zależna. Enzym ten uczestniczy w aktywacji NFκB. Degradacja dwuniciowego RNA, pod wpływem białka P-30, hamuje aktywność tej kinazy, co powoduje między innymi brak aktywacji NFκB [4].

Podobnie, czyli poprzez hamowanie fosforylacji i degradacji IκB, działają białka produkowane w komórkach niektórych bakterii i wirusów. Właściwości takie ma białko YopJ powstające w komórkach *Yersinia pseudotuberculosis*, gliotoksyna, będąca metabolitem grzybów *Aspergillus fumigatus*, czy białko rdzeniowe wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). Ciekawy mechanizm hamowania aktywacji NFκB ma wirus afrykańskiej gorączki świń (ASFV), który zawiera w swym genomie sekwencje kodujące białka o budowie naśladującej IκB, ale nie mające reszt serynowych niezbędnych do procesu degradacji w proteasomach. Białka te łączą się z p65, hamują jego wiązanie z sekwencjami κB DNA i nie dopuszczają tym samym do aktywacji transkrypcji. Właściwości IκB wykorzystano w komórkach nowotworowych poprzez powodowanie w nich ekspresji super-inhibitorowego zmutowanego białka, w którego cząsteczce reszty serynowe zastąpione są alaniną i nie podlegają fosforylacji, reszty lizynowe podlegające ubikwitynacji zastąpione są przez argininę lub też brak jest całkowicie pierwszych 40 aminokwasów podlegających modyfikacjom odpowiedzialnym za degradację IκB. W przeprowadzonych ostatnio badaniach (1999) hamowanie NFκB poprzez ekspresję w komórkach super-inhibitorowego IκB wykorzystano w celu wywoływania apoptozy pod wpływem TNFα komórek opornych na chemioterapię oraz w celu hamowania wzrostu *in vitro* i *in vivo* ludzkich komórek płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi [5].

W badaniach *in vitro* udowodniono działanie hamujące aktywację NFκB w odpowiedzi na TNFα w ludzkich komórkach T i B syntetycznych związków: genisteiny i erbstatyny. Oporne na to działanie pozostawały jednak m.in. komórki fibrosarcoma [6].

Bezpośrednie hamowanie czynności kompleksów NFκB/Rel w ludzkich komórkach raka piersi (*in vitro*) poprzez dostarczanie do komórek białek IκBα, przeciwciał anty-p65 lub dwuniciowych oligonukleotydów zawierających fragmenty kodujące NFκB prowadziło do indukowania apoptozy tych komórek [28]. Z kolei antyoksydanty, takie jak pentoksyfilina i N-acetylocysteina, przeciwdziałają pobudzeniu czynników transkrypcyjnych pod wpływem stresu oksydacyjnego wywoływanego przez nadmierną aktywację cytochromu p450 w odpowiedzi na ekspozycję na wiele karcynogenów środowiskowych.

Zwiększona ekspresja u-PA w komórkach raka gruczołowego trzustki była hamowana *in vitro* przez podawane do komórek białka I $\kappa$ B $\alpha$  oraz przez TPCK (*N-tosyl-L-phenylalaninechloromethylketone*) i deksametazon [32, 33]. Związki te mają jednak małą szansę na zastosowanie w leczeniu nowotworów u ludzi ze względu na wysoką toksyczność (TPCK) i względnie słabą aktywność (deksametazon).

Jak wspomniano wcześniej, białko Tax powstające w komórkach ludzkich na skutek infekcji wirusem HTLV-1 modyfikuje aktywność czynników transkrypcyjnych NF $\kappa$ B. Dowód takiego wpływu białka Tax na komórki może stanowić obserwacja, że oligonukleotydy o sekwencji antysensowej w stosunku do *rel A* hamują zależne od aktywności Tax powstawanie nowotworów u myszy [8]. Wątpliwości budzi jednak fakt hamowania przez takie same oligonukleotydy antysensowne właściwości komórek nowotworowych różnego typu, co może wynikać z ich niespecyficznego wpływu na białka adhezyjne komórek.

Pomimo istnienia dowodów na zdolność NF $\kappa$ B do hamowania apoptozy, białka z tej rodziny ulegają niespodziewanie aktywacji pod wpływem związków o działaniu przeciwnowotworowym, takich jak: mitoksantron, winblastyna, daunomycyna czy paklitaksel (ten ostatni działa dwojako – nie hamuje aktywacji NF $\kappa$ B zależnej od TNF $\alpha$ , natomiast hamuje aktywację wywołaną estrami forbolu). Tak więc można domniemywać, że skojarzenie cytostatyk + inhibitor aktywacji NF $\kappa$ B jest interesujące w sensie klinicznego zastosowania, ponieważ drugi ze związków hamując ten czynnik antyapoptotyczny niweluje potencjalnie niekorzystny efekt tego pierwszego [Deptała, 2001, badania niepublikowane].

## PODSUMOWANIE

Grupa białek Rel/NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B bierze udział w regulacji mechanizmów reakcji immunologicznej, zapalnej, a także procesów proliferacji, obumierania i różnicowania się komórek. W ostatnich latach zebrano szereg dowodów na znaczenie ich aktywacji w procesie onkogenezy. Dzięki obserwacji nowotworowej transformacji komórek zwierzęcych transfekowanych wirusem zawierającym onkoproteinę v-Rel, rozpoczęto badania w kierunku poznania mechanizmów nowotworzenia zachodzącego pod wpływem innych wirusów, takich jak: HTLV-1, HBV, EBV, uzyskując potwierdzenie ich zależności od aktywności białek Rel/NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B. Mutacje, dotyczące tej rodziny czynników transkrypcyjnych i białek regulujących ich działanie, w postaci amplifikacji chromosomów, nadekspresji i rearanzacji genów wykryto w wielu nowotworach wywodzących się z komórek hematopoetycznych oraz w komórkach guzów litych. Dlatego uważa się, że Rel/NF $\kappa$ B może służyć potencjalnie jako marker diagnostyczny komórek o skłonności do transformacji nowotworowej.

Poznanie krystalograficznej struktury białek NF $\kappa$ B i kompleksów NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B, do którego doszło w ostatnich latach, powinno umożliwić opracowanie związków specyficznie hamujących czynniki transkrypcyjne należące do tej grupy. Dotychczas żaden



ze związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym zależnym od ingerencji w regulację aktywności białek Rel/NFκB/IκB nie został poddany kontrolowanym badaniom klinicznym na szerszą skalę. Obawy budzi najprawdopodobniej możliwość wywołania zaburzenia odporności i apoptozy prawidłowych komórek poprzez całkowite i trwałe zablokowanie aktywności NFκB. Ponieważ hamowanie aktywności tego białka ma potencjalną wartość terapeutyczną, w przyszłości należy więc dążyć do stworzenia związków blokujących wybiórczo aktywację Rel/NFκB zachodzącą pod wpływem określonych czynników zewnątrzkomórkowych w wybranych liniach komórek.

## LITERATURA

- [1] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. NFκB. Ten years after. *Cell* 1996; **87**: 13–20.
- [2] BALDWIN AS Jr. The NFκB and IκB Proteins. New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 649–681.
- [3] CABANNES E, KHAN G, AILLET F, JARRETT RF, HAY RT. Mutations in the IκBα gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκBα. *Oncogene* 1999; **18**: 3063–3070.
- [4] DEPTAŁA A, HALICKA HD, ARDELT B, ARDELT W, MIKULSKI SM, SHOGEN K, DARŻYŃKIEWICZ Z. Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase. *Int J Oncol* 1998; **13**: 11–16.
- [5] DUFFEY DC, CHEN Z, DONG G, ONDREY FG, WOLF JS. Expression of a Dominant-Negative Mutant Inhibitor-κBa of Nuclear Factor-κB in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Inhibits Survival, Proinflammatory Cytokine Expression, and Tumor Growth *in Vivo*. *Cancer Research* 1999; **59**: 3468–3474.
- [6] EPINAT J-Ch, GILMORE TD. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/ NFκB signal transduction pathway. *Oncogene* 1999; **18**: 6896–6909.
- [7] FOO SY, NOLAN GP. NFκB to the Rescue. Rel's apoptosis and cellular transformation. *Trends in Genetics* 1999; **15**(6): 229–235.
- [8] GILMORE TD, KOEDOOD M, PIFFAT KA, WHITE DW. Rel/NFκB /IκB proteins and cancer. *Oncogene* 1996; **13**: 1367–1378.
- [9] GRIMM S, BAEUERLE PA. The inducible transcription factor NFκB. Structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 1993; **290**: 297–308.
- [10] GRUMONT RJ, ROURKE IJ, O'REILLY LA, STRASSER A, MIYAKE K. B-Lymphocytes differentially Use the Rel and Nuclear Factor κB1 (NF-κB1) Transcription Factors to Regulate Cell Cycle Progression and Apoptosis in Quiescent and Mitogen-activated Cells. *J Exp Med* 1998; **187** (5): 663–674.
- [11] HOULDSWORTH J, MATHEW S, RAO HP, D'YOMINA K, LOUIE DC. Rel proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996; **87** (1): 25–29.
- [12] JOBIN C, BRADHAM CA, RUSSO MP, JUMA B, NARULA AS, BRENNER DA, SARTOR RB. Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF-κB Activation and Proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I-κB Kinase Activity. *J Immunol* 1999; **163**: 3474–3483.
- [13] JOOS S, OTANO-JOOS MI, ZIEGLER S, BRUDERLINE S, du MANOIR S. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the Rel gene. *Blood* 1996; **87** (4): 1571–1578.
- [14] KARIN M. How NFκB is activated: the role of IκB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999; **18**: 6867–6874.
- [15] KIM DW, SOVAK MA, ZANIESKI G, NONET G, ROMIEU-MARTINEZ R, LAU AW, HAFER LJ, YASWEN P, STAMPFER M, ROGERS AE. Activation of NF-κB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis* 2000; **21** (5): 871–879.
- [16] LIU H-CH, BALTIMORE D. Regulation of the NFκB/Rel transcription factor and IκB inhibitor system. *Current Biology* 1993; **5**: 477–487.
- [17] MIYAMOTO S, VERMA IM. Rel/NFκB/IκB story. *Adv Cancer Res* 1995; **66**: 255–292.
- [18] MORI N, FUJI M, IKEDA S, YAMADA Y, TOMONAGA M. Constitutive activation of NFκB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1999; **93**(7): 2360–2368.
- [19] NARAYANAN R, KLEMENT JF, RUBEN SM, HIGGINS KA, ROSEN CA. Identification of a naturally occurring transforming variant of the p65 subunit of NFκB. *Science* 1992; 256–367.

- [20] NURZYŃSKA D, DEPTAŁA A. Hamowanie potranslacyjnej modyfikacji białek RAS jako nowa metoda terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 2001; **28** (2): 263–276.
- [21] PAHL HL. Activators and target genes of Rel/ NFκB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6853–6866.
- [22] RAYET B, GELINAS C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; **18**: 6938–6947.
- [23] REED JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2941–2953.
- [24] ROUX-DOSSETO M, ROMAIN S, DUSSAULT N, DESIDERI C, PIANA L. C-myc gene amplification in selected node-negative gene cancer patients correlates with high rate of early relapse. *Eur J Cancer* 1992; **28A**: 1600–1604.
- [25] RUBEN S, POTEAT H, TAN TH, KAWAKAMI K, ROEDER R. Cellular transcription factors and regulation of the IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* 1988; **241**: 89–94.
- [26] SHUH K, AVOTS A, TONY HP, SERFLING E, KNEITZ C. Nuclear NF-Atp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leukemia and lymphoma* 1996; **23**: 583–592.
- [27] SIEBENLIST U, FRANZOSO GUIDO, BROWN K. Structure, regulation and function of NFκB. *Annu Rev Cell Biol* 1994; **10**: 405–455.
- [28] SOVAK MA, BELLAS RE, KIM DW, ZANIESKI GJ, ROGERS AE. Aberrant nuclear factor-κB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; **100** (12): 2952–2960.
- [29] STANCOVSKI I, BALTIMORE D. NFκB Activation. The IκB Kinase Revealed? *Cell* 1997; **91**: 299–302.
- [30] SUZUKI T, HIRAI H, MURUKAMI T, YOSHIDA M. Tax protein of HTLV-I destabilizes the complexes of NFκB and IκB and induces nuclear translocation of NFκB for transcriptional activation. *Oncogene* 1995; **10**: 1199–1205.
- [31] VERMA IM, STEVENSON JK, SCHWARZ EM, ANTWERP D, MIYAMOTO S. Rel/NFκB/ IκB family. Intimate tales of association and dissociation. *Genes and Development* 1995; **9**: 2723–2735.
- [32] WANG W, ABBRUZZESE JL, EVANS D, LARRY L, CLEARY KR. The nuclear factor-κB RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Can Res* 1999; **5**: 119–127.
- [33] WANG W, ABBRUZZESE JL, EVANS DB, CHIAO PJ. Overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma is regulated by constitutively activated RelA. *Oncogene* 1999; **18**: 4554–4563.
- [34] WHITESIDE ST, ISRAEL A. IκB proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 1997; **8**: 75–82.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 11.01.2002 r.

Przyjęto: 05.02.2002 r.

Adres autora: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a.

E-mail: [adeptala@amwaw.edu.pl](mailto:adeptala@amwaw.edu.pl)



## ROZWÓJ OSOBNICZY NACZYŃ WIEŃCOWYCH ORAZ NIEKTÓRE ZAGADNIENIA JEGO REGULACJI\*

EMBRYONIC DEVELOPMENT OF CORONARY VESSELS  
AND SOME MECHANISMS OF ITS REGULATION

Anna RATAJSKA

Zakład Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Warszawie

*Streszczenie:* W pracy przedstawiono współczesne poglądy na temat podstawowych etapów rozwoju naczyń wieńcowych u zwierząt doświadczalnych. Materiału tkankowego dla tworzących się naczyń wieńcowych dostarcza przejściowa struktura – narząd przednasilczowy, który formuje się w postaci skupień komórkowych na powierzchni przegrody poprzecznej (u ssaków) lub zatoki żyłnej (u ptaków). Narząd ten jest bezpośrednim prekursorem nasierdzia. Pierwsze zawiązki naczyń w postaci rozproszonych wysp krwiotwórczych, a następnie pączków naczyniowych powstają *in situ* pod nasierdziem w miejscu zatoki żyłnej oraz bruzd: wieńcowej, międzykomorowej i w zagłębieniu utworzonym między formującą się aortą i pniem płucnym pnia tętniczego. Zawiązki te następnie kanalizują oraz w nieznanym sposobie zlewają się w ciągły system naczyniowy. Proksymalne odcinki tętnic wieńcowych powstają z zawiązków naczyniowych, zlokalizowanych wokół pnia tętniczego, które dają wypustki do zatok aorty i tworzą połączenie z jej światłem, formując drożny kanał naczyniowy. Jednocześnie dochodzi do utworzenia drożnego połączenia naczyń żylnych z prawym przedsionkiem oraz zatoką wieńcową. Rozpoczęcie przepływu krwi w skanalizowanym systemie wieńcowym jest m.in. sygnałem do rozpoczęcia różnicowania się prekursorów komórek mięśni gładkich błony środkowej naczyń. Różnicowanie to w wyniku nabywania przez te komórki określonych antygenów fenotypu kurezliwego trwa do końca życia płodowego. Czynniki wzrostu biorące udział w angiogenezie naczyń, takie jak VEGF oraz angiopoetyny (-1 i -2), wykazują ekspresję w sercu płodowym i kolokalizację z miejscami formujących się naczyń wieńcowych. Komórki śródbłonna naczyń wieńcowych pochodzą z rejonu wątroby płodowej, przylegającej do formującego się narządu przednasilczowego, skąd docierają poprzez krezkę serca jako angioblasty (lub ich prekursorzy). Komórki mięśni gładkich błony środkowej naczyń oraz fibroblasty przydanki powstają z komórek mesothelium nasierdzia, które w wyniku transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej podejmują migrację do odpowiednich miejsc miokardium i dają początek odpowiednim liniom komórkowym (miocytom gładkim oraz fibroblastom).

*Słowa kluczowe:* waskulogeneza; angiogeneza; naczynia wieńcowe; embriogeneza; serce płodowe; szczur

\*Praca sponsorowana przez grant KBN (#6P05A02520) oraz wewnętrzny fundusz Akademii Medycznej w Warszawie

**Summary:** This paper presents current views on fundamental stages of coronary vessel development in experimental animals. The tissue for developing vessels comes from the proepicardial organ which is a transiently occurring structure and forms on the surface of the septum transversum (in mammals) or on sinus venosus (in birds). Proepicardium is a forerunner of the epicardium. The first vessel primordia are formed *de novo* subepicardially as isolated blood islands and subsequently vessel buds in the areas of sinus venosus, the coronary and the interventricular sulci, and the aorticopulmonary groove. Then the vessel primordia lumenize and finally coalesce in an unknown way into a continuous vessel system. Proximal parts of the coronary arteries originate from the peritruncal plexus of capillaries which penetrate into the aortic sinuses and form patent connections with the aortic lumen. Concomitantly patent connections are formed between the venules and the right atrium and the coronary sinus. After the blood flow through the patent coronary system have been established mesenchymal cells of the primitive *tunica media* started to differentiate in smooth muscle cells by acquisition of contractile phenotype antigens. This process of differentiation lasts till the end of the prenatal life. The expression of growth factors like VEGF and angiopoietins (-1, -2) is seen in embryonic hearts in areas of vessel formation. Endothelial cells of the coronary vessels derive from angioblasts of the fetal liver area from where they migrate to the proepicardium and then to subepicardium and finally myocardium. Precursors of smooth muscle cells of the coronary vessels and the adventitial fibroblasts derive from the epicardial mesothelium through the epithelial-mesenchymal transformation. Then they migrate to the respective myocardial areas and differentiate into smooth muscle cells and fibroblasts, respectively.

**Key words:** vasculogenesis, angiogenesis, coronary vessels, embryogenesis, fetal heart, rat

## 1. METODY BADAŃ NAD WASKULARYZACJĄ SERCA

Od początku lat dziewięćdziesiątych ostatniego stulecia do chwili obecnej obserwuje się narastający wzrost zainteresowania zagadnieniem tworzenia się naczyń krwionośnych w prawidłowym sercu płodowym. Wiedzę przed tym okresem zawdzięczamy badaniom morfologicznym z zastosowaniem tradycyjnych metod barwienia skrawków tkankowych [45, 46] oraz nastrzykiwania systemu naczyń wieńcowych tuszem lub podobnymi materiałami kontrastowymi [8, 16, 69, 90]. Bardziej precyzyjne badania stały się możliwe z chwilą zastosowania technik immuno-histochemicznych z użyciem swoistych znaczników komórek śródbłonka naczyniowego i ich prekursorów oraz miocytów gładkich tworzących ścianę naczynia. Zastosowanie monoklonalnych przeciwciał QH1, swoistych dla śródbłonek naczyniowych przepiórki japońskiej (*Coturnix coturnix japonica*) [57], pozwoliło na rozpoczęcie pionierskich badań nad rozmieszczeniem związków naczyń u tego gatunku zwierzęcia [59, 91, 92, 93]. Podobne możliwości dało wprowadzenie przeciwciał anty-PECAM-1, które znakują komórki śródbłonka naczyniowego u myszy [86, 71] oraz lektyny pochodzącej z *Griffonia simplicifolia* I, która znakuje swoiście śródbłonki naczyniowe u szczura [2, 29, 79]. Nasza wiedza na temat embriogenezy naczyń poszerzyła się znacznie dzięki zastosowaniu m.in. techniki chimer międzygatunkowych, np. przez wszczepianie komórek zarodkowych przepiórki (pochodzących z nasierdza i zawierających fragment wątroby) do serca rozwijającego się zarodka kurczęcia i śledzenie ich dalszej migracji [59]. Komórki przepiórcze łatwo odróżnić od otaczających tkanek kurczęcia dzięki morfologii ich jąder komórkowych z charakterystyczną grudką chromatyny. Pomocne są również techniki z zastosowaniem znakowanych retrowirusami komórek, które



można podawać do określonych miejsc serca i śledzić ich dalszą lokalizację podczas rozwoju embrionalnego [52, 53]. Najczęściej badanymi za pomocą tych technik gatunkami zwierząt są kura i przepiórka. Dzięki temu, że rozwój zarodkowy u tych gatunków odbywa się poza organizmem matki, pozwala to na powtarzanie pewnych manipulacji i obserwacji na sercu płodowym tego samego osobnika. Szczur i mysz są często badanymi gatunkami, szczególnie, jeśli idzie o techniki transgenizacji i badania rozwoju naczyń pod wpływem określonych genów trwale wprowadzonych do linii komórek zarodkowych. Metody z zastosowaniem preparatów korozyjnych, polegające na podawaniu do naczyń wieńcowych płynnej substancji, która po pewnym czasie twardnieje, dzięki czemu można otrzymać odlew naczyń i badać go w mikroskopie skaningowym, mają zastosowanie do badania naczyń wieńcowych w późniejszych etapach rozwoju. Informacje dotyczące rozwoju naczyń wieńcowych u człowieka są bardzo skąpe i dotyczą jedynie badań opisowych, nie mniej są dla nas bardzo istotne [15, 36, 49].

## 2. ODŻYWIANIE SERCA W RÓŻNYCH STADIACH ROZWOJU OSOBNICZEGO

Serce w czasie rozwoju embrionalnego jest zaopatrywane w tlen i substancje odżywcze w różny sposób:

1. Początkowo wymiana gazowa odbywa się przez zwykłą dyfuzję w poprzek ściany serca od wsierdzia omywanego strumieniem przepływającej krwi do nasierdzia. Ten sposób odżywiania jest możliwy dzięki cienkiej ścianie przedsionków serca i specyficznej strukturze pierwotnych komór. Na te ostatnie składają się cienka ściana miokardium wyposażona w długie, cienkie wypustki, tzw. beleczki sterczące do jam serca [48]. W ten sposób tlen z omywającej wsierdzie krwi dociera do wszystkich komórek drogą dyfuzji. W miarę wzrostu miokardium i grubienia jego ściany [55], odległość od wsierdzia do nasierdzia (dla domniemanej dyfundującej cząsteczki tlenu) zwiększa się. Jest to prawdopodobnie sygnał do tworzenia pierwszych zawiązków naczyniowych [81], które pojawiają się pod nasierdziem. Etap ten kończy się z chwilą utworzenia pierwotnego systemu naczyń wieńcowych w ścianie zatoki żyłnej i wokół proksymalnej i dystalnej części *truncus arteriosus*. Dopóki w tym systemie nie ma połączenia wszystkich kanałów naczyniowych serca z krążeniem ogólnym zarodka poprzez aortę (ze strony tętniczej) i prawy przedsionek (ze strony żyłnej), w tym systemie nie krąży jeszcze krew, lecz płyn tkankowy [91].
2. W wyniku dalszego rozwoju naczyń w rozrastającej się i grubiejącej ścianie serca i utworzenia drożnego połączenia z aortą oraz z prawym przedsionkiem poprzez system pierwotnych tętnic i żył rozpoczyna się przepływ krwi w naczyniach wieńcowych i możliwe staje się odżywianie serca przez kapilary systemu wieńcowego [92].

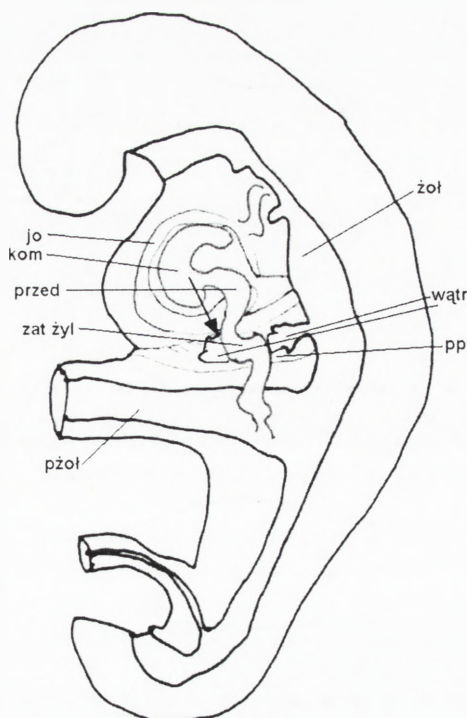
### 3. SPOSOBY POWSTAWANIA NACZYŃ WIEŃCOWYCH

Waskularyzacja serca przebiega z wykorzystaniem dwu mechanizmów: tzw. waskulogenezy (ang. *vasculogenesis*), czyli powstawania naczyń *in situ* z zawiązków komórek śródbłonna – angioblastów [14, 66] oraz angiogenezy (ang. *angiogenesis*), czyli rozrastania się sieci naczyniowej poprzez tworzenie wypustek z istniejących naczyń [66,67].

### 4. POWSTAWANIE I ROZWÓJ NARZĄDU PRZEDNASIERDZIOWEGO

Początek rozwoju unaczynienia serca jest przestrzennie i czasowo związany z rozwojem nasierdza, zatem pomocne będzie krótkie przedstawienie etapów rozwoju nasierdza, które bezpośrednio poprzedza rozpoczęcie waskularyzacji serca. Obecność nasierdza warunkuje rozpoczęcie waskularyzacji: myszy pozbawione nasierdza nie przejawiają też cech prawidłowego rozwoju naczyń wieńcowych [42, 96]. Zawiązkiem nasierdza jest tzw. narząd przednasierdziowy (ang. *proepicardium*), który jest tworem przejściowym zarówno u ptaków, jak i ssaków. Jego topografia oraz morfologia różni się nieco u tych grup zwierząt. U ssaków powstaje w obszarze przegrody poprzecznej [38, 41], a u ptaków (u których nie ma przegrody poprzecznej, ponieważ nie powstaje u nich przepona) na brzusznej powierzchni obu rogów zatoki żyłnej [32, 88]. W rezultacie są to te same miejsca, do których ściśle przylega zawiązek wątroby (ryc. 1). W obu przypadkach (u ptaków i ssaków) nabłonek pokrywający narząd przednasierdziowy pochodzi z sześciennych komórek powierzchni brzusznej nabłonka osierdziowego, przylegającego do przegrody poprzecznej (u ssaków), lub do obu rogów zatoki żyłnej (u ptaków). Wnętrze narządu natomiast ma ciągłość anatomiczną z wątrobą płodową. Komórki nabłonka osierdzia przekształcają się w komórki płaskie (*mesothelium*) pokrywające narząd przednasierdziowy, który sterczy w postaci wyrostków palczastych (u ptaków) lub pęcherzykowatych nacieków komórkowych (u ssaków) do jamy osierdzia w stronę grzbietowej ściany bruzdy przedsionkowo-komorowej zapętłającego się serca (ryc. 2a,b). W ten sposób szczytowe powierzchnie wyniosłości przednasierdzia dotykają do grzbietowej ściany bruzdy przedsionkowo-komorowej, nie tworząc początkowo z nią ścisłego kontaktu [32]. Następnie wyniosłości te, pokryte nabłonkiem płaskim rozrastają się w określonych kierunkach na powierzchni serca (ryc. 2b,c). Komórki nabłonka (*mesothelium*) napętlają z rejonu zatoki żyłnej do grzbietowej powierzchni tworzącej się bruzdy przedsionkowo-komorowej po mniejszej krzywiźnie serca, po czym w kierunku brzusznej powierzchni serca. W dalszym ciągu warstwa nasierdzia posuwa się w kierunku przedsionka i rejonu opuszki, z pewnym opóźnieniem na powierzchni brzusznej. W ten sposób powierzchnia kontaktu między narządem przednasierdziowym a sercem zwiększa się i skupienia komórkowe pełnącego przednasierdzia w zwiększonej ilości znaleźć można na bruzdach zatokowo-

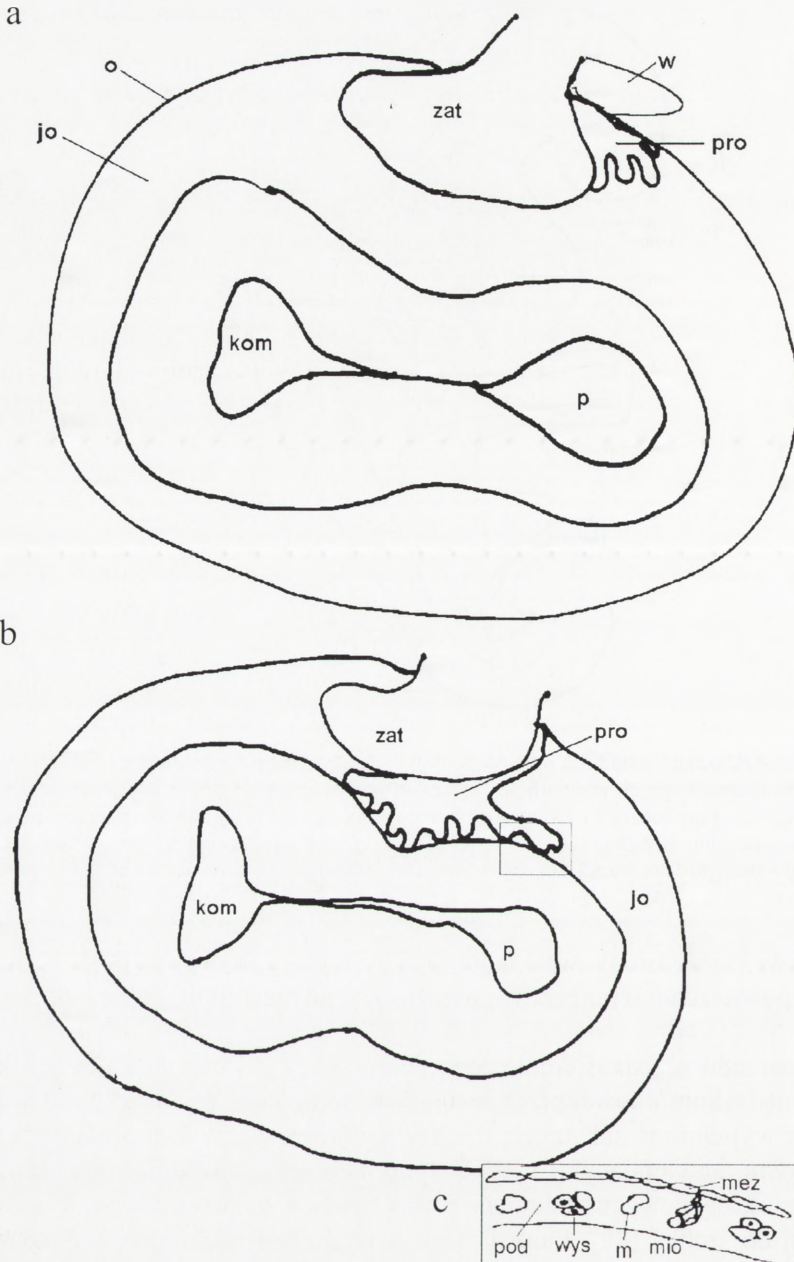




RYCINA 1. Zarodek ssaka ze stadium rozwoju, odpowiadającym pierwszym etapom formowania się narządu przednasilrdziowego, tj. w chwili gdy serce ulega zapętleniu – topografia przestrzenna serca, osierdzia, przegrody poprzecznej i zawiązka wątroby: miejsce tworzącego się narządu przednasilrdziowego zaznaczono strzałką, zat żyl – zatoka żylna, przed – przedsionek, kom – komora, st – stożek serca, pp – przegroda poprzeczna, wątr – zawiązek wątroby, jo – jama osierdzia, pżół – przewód żółtkowy

przedsionkowej, przedsionkowo-komorowej i międzykomorowej [94]. W miarę pokrywania powierzchni serca przez nasierdzie, narząd przednasilrdziowy stopniowo zanika.

Rozwój narządu przednasilrdziowego polega na wytwarzaniu znacznej ilości substancji międzykomórkowej przez komórki *mesothelium*. W związku z tym jego wnętrze jest wypełnione substancją międzykomórkową oraz komórkami mezenchymatycznymi, zawierającymi cytokeratynę, hemocytoblastami, angioblastami, kapilarami oraz kanalikowymi strukturami powstałymi w wyniku wpuklania się komórek *mesothelium* do środka [88]. Funkcja tego narządu jest wieloraka: angiogeneza, hemopoza, obróbka macierzy pozakomórkowej oraz dostarczanie materiału komórkowego do tworzącego się nasierdzia (nabłonek *mesothelium* oraz podnasilrdzie). Bliskość topograficzna przednasilrdzia i wątroby płodowej tłumaczy właściwość hematopoetyczną tego narządu [38, 88]. W ten oto sposób komórki mezenchymatyczne przednasilrdzia oraz inne elementy komórkowe (hemocytoblasty) mają ciągłość przestrzenną z tworzącym się podnasilrdziem (ryc. 2c).



RYCINA 2. Przekrój poprzeczny serca ssaka na poziomie narządu przednasilrdziowego; schemat pokazuje połozenie narządu przednasilrdziowego względem zapętlającego się serca (serce człowieka około 24 dnia rozwoju); a,b – kolejne etapy rozwoju i rozprzestrzeniania się narządu przednasilrdziowego po powierzchni miokardium; w ramce (c) pokazano powiększenie nasilrdzia i podnasilrdzia powstałych z narządu przednasilrdziowego; jo – jama osilrdzia; pro – narząd przednasilrdziowy; zat – zatoka żylna; p – przedsionek; kom – komora; mez – nabłonek (*mesothelium*) nasilrdzia; wys – wyspy krwiotwórcze (skupienia angioblastów i erytroblastów); m – komórki mezenchymatyczne; mio – miokardium, pod – podnasilrdzie



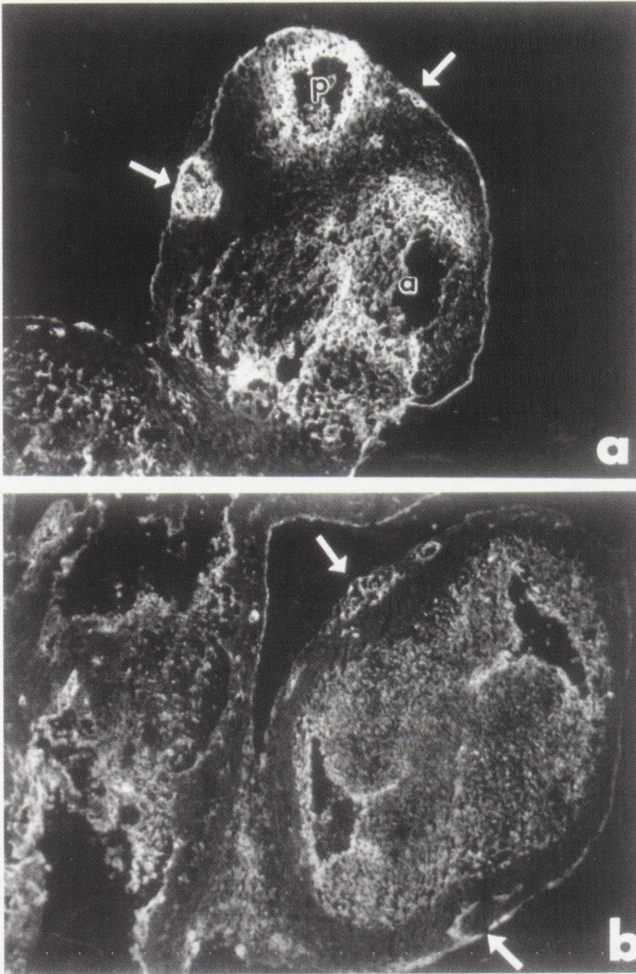
## 5A. ETAPY WASKULARYZACJI SERCA

Pierwsze oznaki waskularyzacji serca, niezależnie od gatunku, zaczynają być widoczne po jego zapętleniu, czyli utworzeniu pierwotnego, 4-jamistego serca.

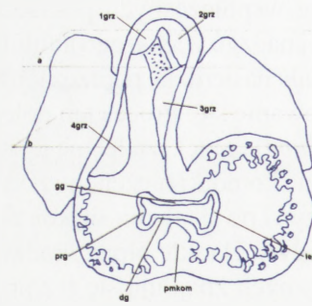
PrzedSIONKI oddzielone są od komór kanałem przedSIONKOWO-KOMOROWYM z formującymi się guzami WSIERDZIOWYMI, stożek serca i pień tętniczy są pojedynczym kanałem wyściełanym grzebieniami stożka i pnia, a pierwotne komory składają się z tzw. MIOKARDIUM ZBITEGO i są wyposażone w system beleczek mięśniowych (tzw. MIOKARDIUM GĄBCZASTE). Serce jest całkowicie pokryte nasierdziem (ryc. 3c). U ssaków etap ten odpowiada 13 dobie życia wewnątrzmacicznego (czyli drugiej połowie życia płodowego), u ptaków stadium rozwoju HH32 (*Hamburger Hamilton stage*) [27], a u człowieka – 32.–37. dobie życia płodowego. Wielu autorów wysuwa przypuszczenie, że wzrost grubości ściany MIOKARDIUM jest podstawą do rozpoczęcia waskularyzacji.

W rozwoju naczyń wieńcowych wyróżnić możemy kilka procesów. Pierwszym jest niewątpliwie tworzenie w warstwie podnasierdziowej rozproszonych, oddzielnych struktur, tzw. wysp krwiotwórczych, które są zawiązkami naczyń [31, 36, 68, 80]. Struktury te nie mają żadnego anatomicznego połączenia z krwiobiegiem zarodka i składają się ze skupień dwu typów komórek: erytroblastów i angioblastów. Do tej pory, serce nigdy nie było traktowane jako narząd krwiotwórczy [38, 88, 89], choć takim pozostaje we wczesnych etapach rozwoju naczyń. Pochodzenie komórek wchodzących w skład wysp krwiotwórczych było przedmiotem badań [20, 53, 59]. Badania na chimerach międzygatunkowych wykazały, że prekursorzy komórek śródbłonna naczyniowego – angioblasty pochodzą z rejonu wątroby płodowej, skąd poprzez narząd przednasierdziowy migrują do podnasierdzia, a następnie do MIOKARDIUM, dając początek splotowi kapilar podnasierdziowych oraz naczyniom MIOKARDIUM [59, 92]. Wyniki tych badań obaliły wcześniejsze poglądy głoszące, że komórki śródbłonna naczyń pochodzą z *endothelium* beleczek WSIERDZIA przez wpuklanie się ich do MIOKARDIUM i tworzenie odgałęzień naczyniowych [17, 18, 46, 90].

Według współczesnych poglądów prekursorzy komórek mięśni gładkich błony środkowej naczyń większego kalibru oraz fibroblasty przydanki pochodzą z komórek *mesothelium* nasierdzia, poprzez ich transformację nabłonkowo-mezenchymalną, czyli odróżnicowanie się. Proces ten polega na utracie właściwości komórki nabłonkowej (*mesothelium*) i przekształcenie jej w komórkę mezenchymatyczną [20, 93]. Powstałe z nasierdzia komórki mezenchymatyczne wędrują do miejsc formowania się pierwotnych naczyń i po ustaleniu się kontaktu ze śródbłonkiem, rozpoczynają różnicowanie się w miocyty gładkie błony środkowej [20, 53, 93]. W populacji komórek mezenchymatycznych znajdują się też przyszłe fibroblasty, które po ustaleniu kontaktu z pierwotną ścianą naczynia rozpoczynają różnicowanie w fibroblasty błony zewnętrznej naczynia. Prekursorzy fibroblastów mogą też migrować do odległych miejsc i zasiedlać rejon przyszytych zastawek serca lub formować element składowy przyszłych pierścieni włóknistych.



RYCINA 3. Zawiązki naczyń w postaci wysp krwiotwórczych w pniu tętniczym w dniu 14. rozwoju embrionalnego szczura, wyznakowane lektyną sprzężoną z fluoresceiną (GSI-FITC): a – część dystalna pnia tętniczego z zawiązkami naczyń w tworzącej się bruzdzie aortalno-płucnej (strzałki); b – część proksymalna pnia tętniczego z zawiązkami naczyń w grzbietowej i brzusznej bruzdzie pnia tętniczego, położenie zawiązków naczyń odpowiada miejscom najbardziej oddalonym od strumienia krążącej krwi; c – schemat serca z tego etapu rozwoju; zaznaczono płaszczyzny cięcia w części dystalnej (poziom a) i proksymalnej (poziom b); 1grz – prawy górny grzebień pnia tętniczego; 2grz – lewy dolny grzebień pnia tętniczego; 3grz – lewy brzuszny grzebień stożka, 4grz – prawy grzbietowy grzebień stożka; pmkom – przegroda międzykomorowa; gg – górny guz wsierdziowy; dg – dolny guz wsierdziowy; leg – lewy guz wsierdziowy; prg – prawy guz wsierdziowy





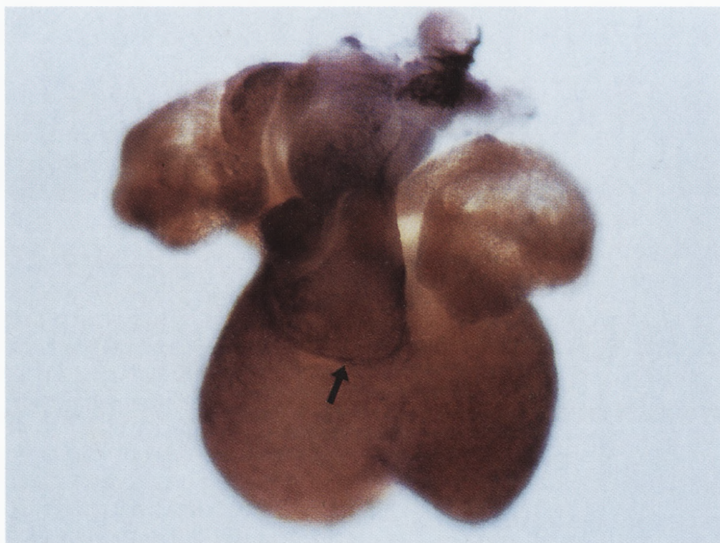
## 5B. LOKALIZACJA ZAWIĄZKÓW NACZYŃ WIEŃCOWYCH

Pierwsze struktury naczyniowe w postaci tzw. „wysp krwiotwórczych” powstają w sercu pod nasierdziem w okolicy zatoki żyłnej. Innym miejscem formowania się zawiązków naczyń są: bruzda przedsionkowo-komorowa, bruzda międzykomorowa oraz tworzące się zagłębienie pnia tętniczego w czasie jego rozdzielania się na pień płucny i aortę (ryc. 3a,b) [62].

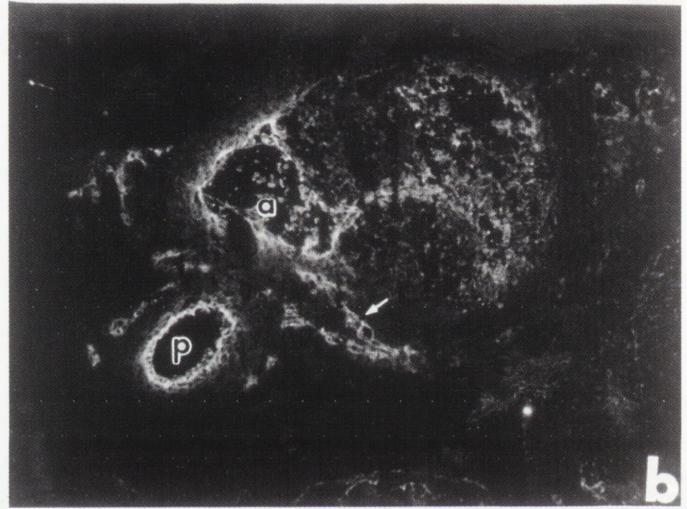
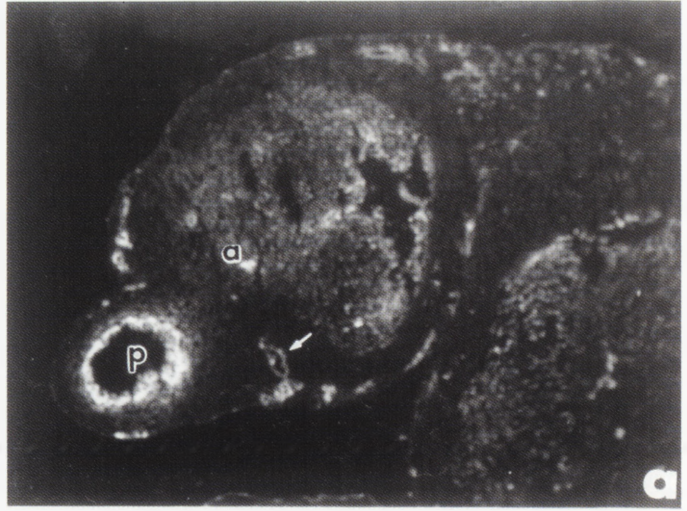
Struktury te następnie kanalizują, tworząc niezależne, rozproszone pęczki naczyniowe: komórki śródbłonna układają się na zewnątrz, a erytroblasty w śświecie. Stopniowo angioblasty różnicują się w komórki śródbłonna, a erytroblasty w erytrocyty. Następnie te niezależne przestrzennie, pierwotne struktury naczyniowe zlewają się w drożny system o wspólnym kanale. Istniejąca sieć naczyń wieńcowych rozrasta się w wyniku angiogenezy w system wieńcowy. Przez cały czas trwania życia płodowego naczynia powstają też w wyniku waskulogenezy [68].

## 5C. POWSTAWANIE I ROZWÓJ TĘTNICZYCH NACZYŃ WIEŃCOWYCH

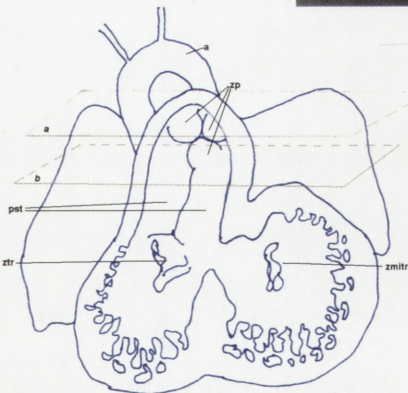
Powstawanie zawiązków naczyń tętniczych serca odbywa się drogą waskulogenezy. Pierwszym etapem jest formowanie się na terenie opuszki serca (ang. *out-flow tract*) tzw. splotu kapilar podnasierdziowych [12, 95]. Tworzą się one z wysp krwiotwórczych i wtórnych kanałów naczyniowych, które oplatają opuszkę, a następnie



RYCINA 4. Pierścień kapilar wokół opuszki serca myszy uwidoczniony przez wyznakowanie całego serca płodowego przeciwciałami anti-PECAM-1 (zaznaczono strzałką), widoczne również zawiązki innych naczyń wieńcowych w postaci delikatnej siatki, które zostały wyznakowane tą samą techniką



C



RYCINA 5. Pień tętnicy z początku 15. doby życia płodowego szczura, przekrój poprzeczny, znakowanie lektyną (GSI-FITC), penetracja zawiązków kapilar do tej samej zatoki aorty na dwu poziomach: dalszym (a) i bliższym (b); zaznaczono strzałkami; tylko jeden z tych zawiązków pozostanie proksymalnym odcinkiem tętnicy wieńcowej; (c) – schemat serca z tego etapu rozwoju; zaznaczono płaszczyzny cięcia skrawków tkankowych: dalszą, dla poziomu (a) i bliższą dla poziomu (b); a – aorta; p – pień płucny; zp – zastawka półksiężycowata pnia płucnego; pst – przegroda stożka, ztr – zastawka trójdzielnia; zmitr – zastawka mitralna



pień tętniczy serca. Początkowo kształt splotu kapilar wokół opuszki przypomina półksiężyc, obejmujący od strony grzbietowej (aortalnej) pień tętniczy. Stopniowo półksiężyc ten wydłuża swe końce i nabiera kształtu pełnego pierścienia, w miarę jak splot kapilar rozrasta się obejmując opuszkę od strony brzusznej (ryc. 4). Pierścień ten rozrasta się następnie na grubość w stronę bliższą i dalszą pnia tętniczego. Z tego podnasilczego splotu kapilar pnia tętniczego wyrastają w stronę zatok aorty (tych, które znajdują się naprzeciwko pnia płucnego) zawiązki naczyń, które dają początek proksymalnym odcinkom tętnic wieńcowych [10, 11, 12, 59, 95]. Proksymalne odcinki tętnic wieńcowych powstają zatem drogą angiogenezy [62]. Opuszka, a następnie pień tętniczy serca są również miejscem powstawania kapilar oraz rozrastania się tego systemu naczyniowego. W tym czasie dochodzi do znacznego skrócenia opuszki serca i wpływa to na ostateczny kształt i miejsce penetracji zawiązków tętnic wieńcowych do zatok aorty [62]. Interesujące, że w czasie tego etapu rozwoju jest wiele prób wrastania zawiązków naczyń w stronę zatok aorty, po dwie lub nawet trzy do każdej zatoki, a nawet dodatkowo do trzeciej zatoki aorty [59, 62] (ryc. 5a,b). Ostatecznie jednak tylko dwa zawiązki pozostają jako proksymalne odcinki tętnic wieńcowych: lewej i prawej. Taki sposób powstawania tętnic wieńcowych poprzez penetrację zawiązków naczyń do zatok aorty, a nie poprzez odpączkowanie od aorty (według poglądu wcześniejszego) [1, 36, 87] tłumaczy powstawanie wrodzonych wad naczyń wieńcowych, jak np. nieprawidłowe odejście naczyń tętnicznych w zespole Bland-White-Garlanda [9], lub inne zaburzenia systemu wieńcowego [3,4].

Wytwarzanie splotu podnasilczego kapilar oraz wrastanie zawiązków naczyń tętnicznych do aorty odbywa się na etapie rozwoju serca, kiedy dochodzi do podziału stożka serca i pnia tętniczego na dwa kanały za pomocą rosnących w określonych kierunkach – skośnie i spiralnie grzebieni stożka. Dystalna część opuszki (pień tętniczy) ulega podziałowi na aortę i pień płucny, kiedy pierwsze zawiązki naczyń penetrują w stronę odpowiednich zatok aorty. W chwili, kiedy dochodzi do pełnego połączenia z aortą i utworzenia światła w proksymalnym odcinku tętnicy wieńcowej, część bliższa opuszki (stożek serca) zostaje podzielona w pełni na dwa odrębne ujścia dla lewej i prawej komory (ryc. 5c).

W ciągu następnych etapów rozwoju długość pierwotnych tętnic wieńcowych (i ich odgałęzień) wzrasta w postępie geometrycznym, wydłużając się w stronę koniuszka serca. W tym czasie długość komory serca wzrasta liniowo w miarę upływu kolejnych dni rozwoju embrionalnego [64].

Formowanie się błony środkowej odbywa się poprzez dołączanie się komórek mezenchymalnych do pierwotnej ściany naczynia utworzonego przez komórki śródbłonka. Proces ten rozpoczyna się przed utworzeniem drożnego systemu wieńcowego, tzn. zanim zawiązki obu tętnic wieńcowych wytworzą połączenia ze światłem aorty [62]. Udrożnienie systemu wieńcowego z prawym przedsionkiem (od strony żyłnej) wykazano u przepiórki japońskiej w tym samym czasie, kiedy dochodzi do udrożnienia z aortą, tj. HH32 (*Hamburger & Hamilton stage 32*) [27, 91]. Z chwilą powstania drożnego połączenia naczyń wieńcowych od strony tętnicznej i od strony

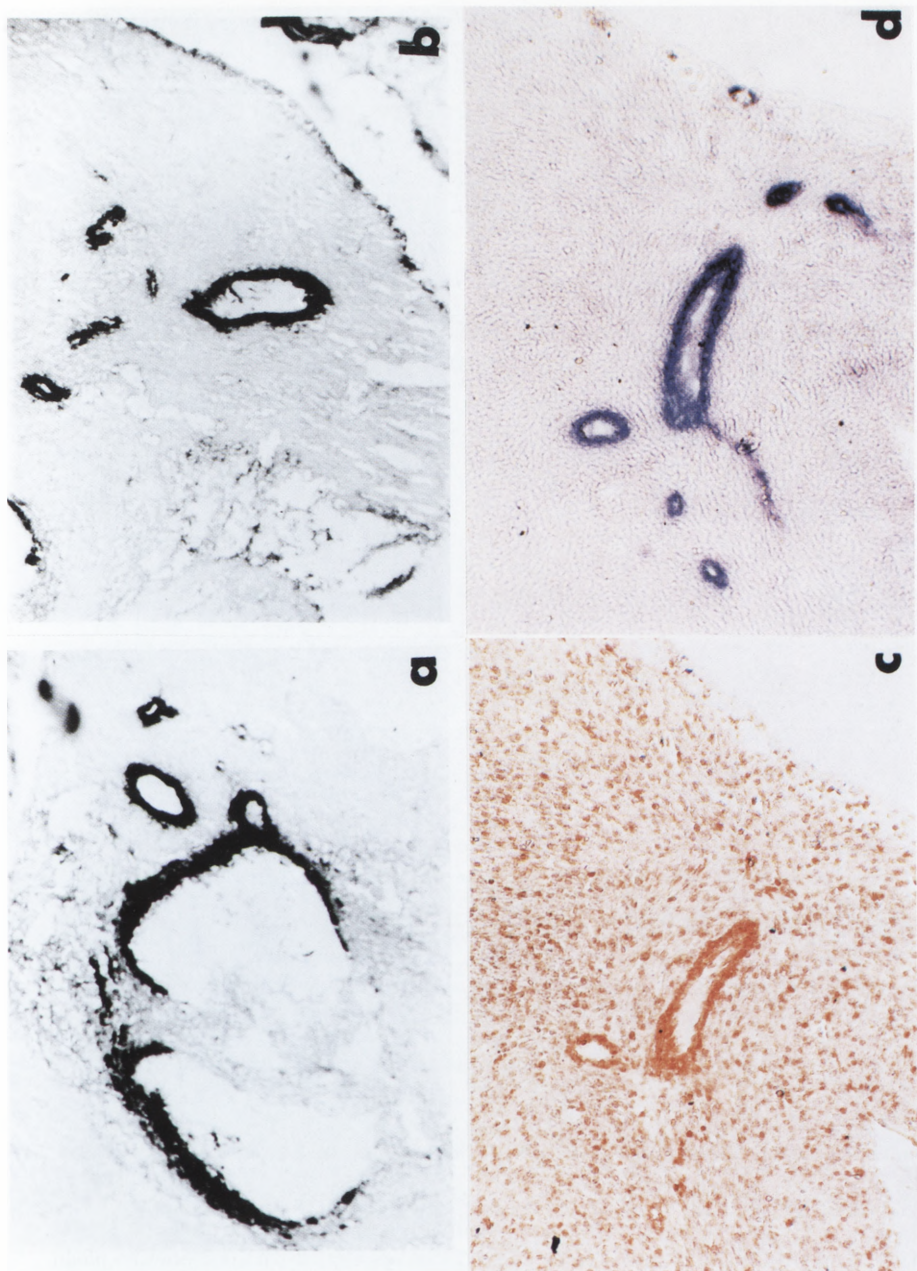
żylny z krążeniem ogólnym zarodka rozpoczyna się przepływ krwi w systemie wieńcowym. Ta zmiana hemodynamiczna może mieć wpływ na rozpoczęcie różnicowania się błony środkowej i błony zewnętrznej ściany naczyń tętniczych, ponieważ z tą chwilą obserwuje się pojawianie się pierwszych cech fenotypu kurczliwego w różnicujących się komórkach mięśni gładkich błony środkowej naczyń [62].

Różnicowanie się komórek błony środkowej ściany naczyń rozpoczyna się od końca bliższego tętnic wieńcowych i postępuje w stronę koniuszka serca. Na podstawie własnych badań na szczurach oraz publikowanych prac nad innymi gatunkami zwierząt [33, 65, 92] stwierdzono, że pierwszym białkiem kurczliwym miocytów gładkich wieńcowych naczyń tętniczych jest  $\alpha$ -aktyna miocytów gładkich ( $\alpha$ -SMA). W miocytach naczyń żylnych  $\alpha$ -SMA pojawia się po kilku dniach, (u szczura od ED18). Następnie (u szczura) pojawia się odmiana miozyny miocytów gładkich (SM-MHC)(ED17) (ryc 6a,b) i w kolejnych etapach rozwoju postępuje w dół, w stronę koniuszka serca. Innym często badanym antygenem jest 1E12 – należący do rodziny  $\alpha$ -aktynin. Antygen ten pojawia się w systemie tętnic wieńcowych po raz pierwszy w dobie 18. (ED18). Antygen 1E12 zanika w naczyniach wieńcowych w miarę zwiększania odległości od aorty, wykazując nieciągły charakter w błonie środkowej dalszych odcinków tętnic wieńcowych. Podobnie jak  $\alpha$ -SMA, antygen 1E12 nie jest specyficzny dla embrionalnych miocytów gładkich, ponieważ występuje też na terenie cytoplazmy kardiomiocytów. U przepiórki i kury antygen 1E12 pojawia się przed SM-MHC [35, 56, 92]. Poza tym 1E12 nie występuje w błonie środkowej wieńcowych naczyń żylnych embrionów szczura, w przeciwieństwie do naczyń żylnych przepiórki, gdzie ulega ekspresji [91,92]. Te różnice w czasowo-przestrzennej ekspresji białek systemu kurczliwego i/lub cytoszkieletu mogą wskazywać na dużą zmienność odmian fenotypowych i aktywności miocytów gładkich, związaną z różnicami międzygatunkowymi.

Rola smudeliny – niedawno opisanego białka komórek mięśni gładkich, występującego w trzech odmianach nie jest dokładnie poznana. Wydaje się, że białko to występuje w komórkach w pełni przystosowanych do aktywnego skurczu [39, 40, 83, 84]. Wyniki badań nad rozmieszczeniem smudeliny w sercach płodowych szczura potwierdzają rolę tego białka: pojawia się ono najpóźniej w rozwoju embrionalnym w porównaniu z innymi badanymi białkami oraz w tych fragmentach proksymalnych odcinków tętnic wieńcowych, które składają się z kilku do kilkunastu warstw miocytów gładkich (ED 19 u szczura) (ryc. 6c,d). Wyniki wskazują, że smudelina ulega ekspresji w najbardziej dojrzałych częściach drzewa wieńcowego od strony tętniczej [65]. W błonie środkowej wielkich tętnic serca smudelina nie występuje we wszystkich komórkach miocytów gładkich. Zróżnicowana ekspresja trzech odmian smudeliny [21, 40] podczas rozwoju embrionalnego innych narządów odzwierciedla także istnienie różnych fenotypów miocytów gładkich, tych które występują w ścianie naczyń oraz tych które są składnikiem ściany jelita, macicy, żołądka.

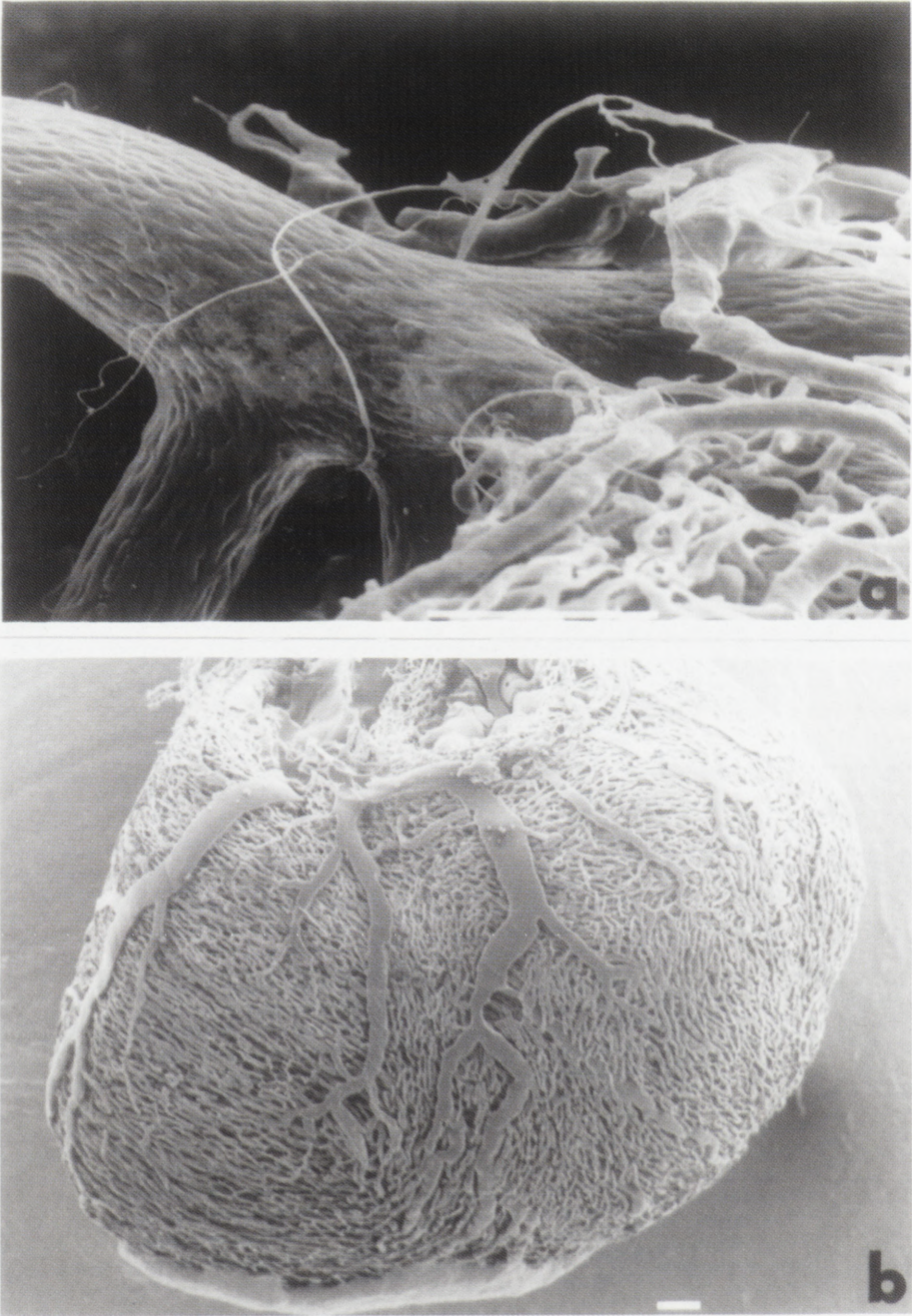
Wyniki badań nad pojawianiem się poszczególnych białek w ścianie naczyń u szczura potwierdzają dynamiczność procesu rozwojowego oraz różnorodność fenotypów mo-





RYCINA 6. Ekspresja miozyny w początkowym odcinku tętnicy wieńcowej, przy odejściu od aorty (a) oraz w jej odgałęzieniach (b) podczas 17 doby rozwoju embrionalnego szczura; (c) – lokalizacja smudeliny w dojrzałych miocytach błony środkowej tętnic wieńcowych w 20 dobie życia płodowego szczura; (d) – na skrawku sąsiednim pokazano lokalizację a SMA, która znakuje większą liczbę naczyń w porównaniu z smudeliną oraz naczyńia żyłne.





RYCINA 7. a – Tętnica wieńcowa lewa (odcinek bliższy) i jej odgałęzienia u 20-dobowego płotu szczura pokazana techniką korozyjną; widoczne podłużne względem kierunku przepływu krwi „odciski” komórek śródbłonna naczyniowego na powierzchni preparatu korozyjnego; b – Prawo-tylna powierzchnia serca z 19. doby życia płodowego szczura; preparat korozyjny pokazuje układ żył wieńcowych na powierzchni prawej i lewej komory oraz sieć kapilar serca, przedsionki usunięto



cytów gładkich w poszczególnych odcinkach systemu wieńcowego. Należy zaznaczyć, że proces rozwoju naczyń wieńcowych nie kończy się z chwilą zakończenia życia płodowego. U szczura rozwój trwa co najmniej do 3–4. tygodnia po urodzeniu [5, 82].

## 6. PRZEBIEG DUŻYCH NACZYŃ WIEŃCOWYCH (ŻYL I TĘTNIC) U RÓŻNYCH GATUNKÓW ZWIERZĄT

Badania na tym polu na zwierzętach doświadczalnych są fragmentaryczne. Ograniczają się jedynie do niewielu prac w piśmiennictwie światowym [7, 16].

U gryzoni praktycznie istnieją dwie tętnice wieńcowe, które w początkowym odcinku przebiegu (w ścianie miokardium) dają odgałęzienia na gałęzie potomne oraz biegną w ścianie miokardium, a nie podnasierdziowo. Lewa, daje cztery (najczęściej) lub trzy odgałęzienia, które biorą początek z dwu gałęzi (ryc 7a). Te potomne gałęzie unaczyniają brzeżną część przedniej ściany lewej komory, a gałęzie głębokie (w ilości 1 lub 2) unaczyniają przednią część przegrody międzykomorowej. Prawa tętnica wieńcowa daje 4 lub 5 odgałęzień, które unaczyniają miokardium prawej komory oraz wędrują w stronę bocznej i przedniej części miokardium prawej komory. Na temat powstawania żył wieńcowych nie ma praktycznie danych w piśmiennictwie światowym. Jedyne informacje dotyczą badań u przepiórki japońskiej [91]. U gryzoni (szczur) położenie żył i ich przebieg jest zlokalizowany podnasierdziowo. Żyły większego kalibru biegną na tylnej powierzchni serca w środkowej części prawej i lewej komory (ryc. 7b). Żyły z tej części serca wpadają do zatoki wieńcowej. Tylko w niektórych odcinkach przebiegu żyły wieńcowe towarzyszą odpowiednim gałęziom tętnic, przy czym tętnice wieńcowe biegną w miokardium, podczas gdy odpowiadające im odcinki żył – podnasierdziowo. Na przedniej powierzchni serca duże żyły wieńcowe są krótkie, sięgają do podstawy stożka prawej komory. U szczura nie ma praktycznie odpowiednika żyły wielkiej serca, która u ludzi biegnie od koniuszka serca w bruździe międzykomorowej przedniej i wpada do zatoki wieńcowej.

## 7. MECHANIZMY WASKULARYZACJI SERCA

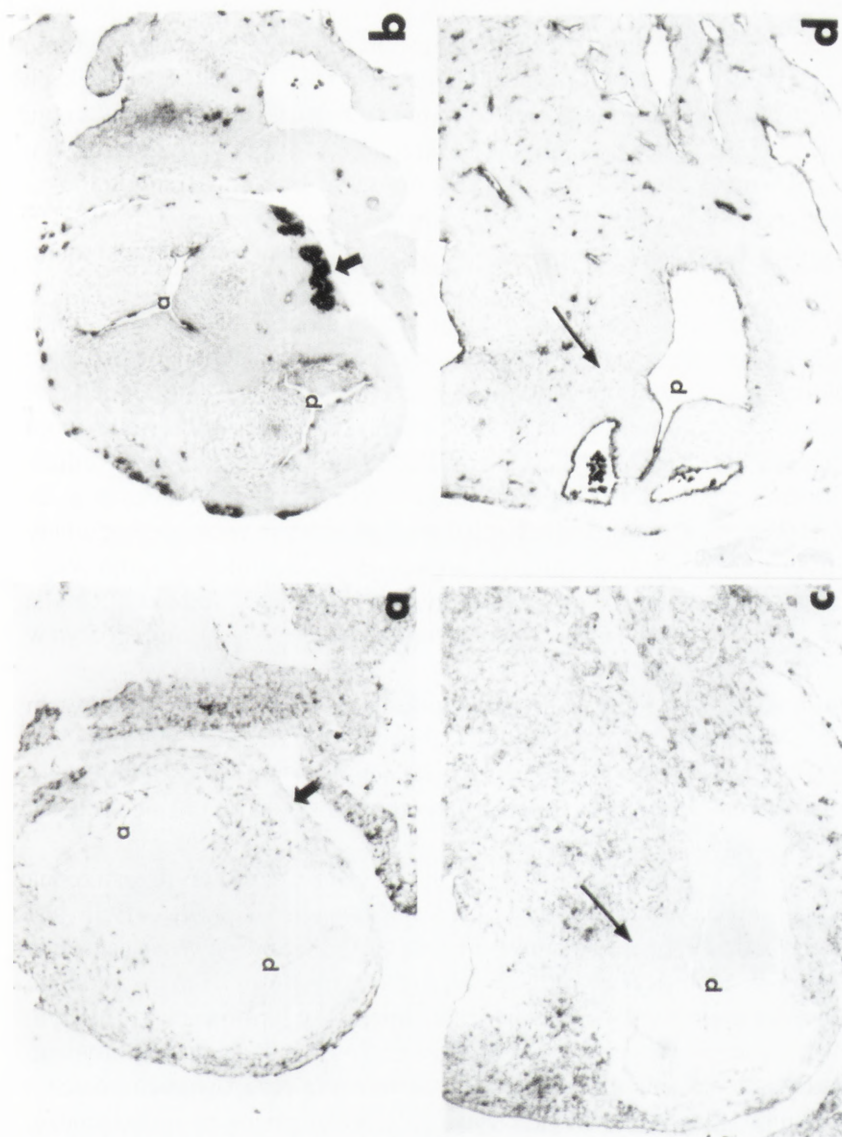
Nasza wiedza na temat mechanizmów regulacji rozwoju naczyń oraz kształtowania się i dojrzewania ściany naczynia jest coraz większa, choć nadal wiele zagadnień pozostaje bez odpowiedzi. Wśród czynników regulujących angiogenezę śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF) oraz ostatnio opisane angiopoetyny (Ang-1 i Ang-2) wydają się być najbardziej specyficzne. Specyficzność działania tych czynników jest związana z obecnością odpowiednich receptorów jedynie na powierzchni komórek śródbłonka (lub ich prekursorów – angioblastów). Dla VEGF są to *flt-1* (VEGFR1) oraz *KDR* lub *flk-1* (VEGFR2) [22, 54, 77]. Dla angiopoetyn – *Tie-2* (zwany dawniej *tek*) [23, 60, 70]. VEGF został opisany [24, 25, 76] jako substancja parakrylna

stymulująca wzrost naczyń, ich pączkowanie oraz proliferację komórek śródbłonka. VEGF jest znany również jako substancja stymulująca wzrost przepuszczalności ściany naczynia [73]. VEGF występuje w kilku odmianach, które są wynikiem alternatywnego składania transkryptu [44].

W embrionalnym sercu VEGF ulega ekspresji przed rozpoczęciem formowania się pierwszych zawiązków naczyniowych. Jego bezpośredni wpływ na powstawanie naczyń wieńcowych wykazaliśmy na modelu hodowli serca *in vitro* w obecności tego czynnika w podłożu hodowlanym [61]. Embrionalne serce kurczęcia można utrzymywać w hodowli przez kilka lub kilkanaście dni na specjalnie przygotowanym podłożu kolagenowym w obecności pożywki. Dzięki automatyzmowi serce pracuje oraz może być utrzymywane przy życiu i zachodzą w nim zmiany morfogenetyczne, które można badać poza organizmem żywym. W takim samym modelu *in vitro* udało się hodować serca szczura. Egzogenny VEGF powoduje, że z zawiązków naczyń serca płodowego (ED14) wyrastają naczyniopodobne struktury, zagłębione w żelu kolagenowym, tworzące światło. W podłożu hodowlanym oraz endogennie (w hodowanym sercu płodowym) wykryto obecność białka VEGF metodą *Western blot* oraz wykazano, że zasadowy czynnik wzrostu (bFGF) stymuluje ekspresję VEGF w sercach hodowanych *in vitro*. Zasadowy FGF dodany do podłoża wpływa na migrację komórek, która jest jedną z aktywności komórkowych podczas angiogenezy i staje się tym samym niezbędnym składnikiem waskularyzacji serca. Zasadowy FGF stymuluje migrację komórek mezenchymalnych w hodowli serca 12-dobowego (awaskularnego) oraz działa synergistycznie z VEGF na migrację komórek w tym modelu eksperymentalnym [61]. Nie wpływa natomiast na tworzenie struktur naczynio-podobnych *in vitro*. Wykazano również ekspresję genu VEGF, obecność oraz lokalizację VEGF w rozwijającym się sercu płodowym [79]. Początkowo gen VEGF ulega ekspresji pod nasierdziem tam, gdzie powstają pierwsze zawiązki naczyń. Taką lokalizację VEGF można wytłumaczyć działaniem czynnika stymulującego gen dla VEGF, jakim jest względna hipoksja [72, 74]. Wydaje się, że pod nasierdziem, odległym od omywanego krwią wsierdzia występuje pewien niedosyt tkankowego stężenia tlenu, powodując wzmożenie ekspresji genu VEGF poprzez czynnik transkrypcyjny HIF (ang. *hypoxia inducible factor*) [30, 43].

Angiopoetyny (1 i 2) są znane jako czynniki stabilizujące ścianę tworzącego się naczynia [19, 47, 76] oraz regulujące oddziaływanie komórek śródbłonka z nieśródbłonkowymi elementami komórkowymi ściany naczynia (perycyty, mioocyty gładkie). Ang-1 jest ligandem aktywującym receptor Tie-2, Ang-2 jest jego antagonistą. Ponadto, Ang-2, w zależności od obecności lub braku w otoczeniu komórkowym VEGF może działać stymulująco na angiogenezę, poprzez rozluźnienie oddziaływań międzykomórkowych, lub odpowiednio hamować ją, przez uszczelnienie oddziaływań międzykomórkowych [6, 58]. Wyniki te pochodzą z badań nad hodowanymi komórkami śródbłonka w systemie *in vivo* pod rogówką oka. Ostatnio opisano Ang-3 i Ang-4 [85]. Potwierdzono również obecność odmian Ang-1 i Ang-2 w związku z alternatywnym składaniem transkryptu obu genów [34, 51]. Wykazano ponadto, że mRNA dla Ang-2 ulega regulacji pozytywnej w warunkach hipoksji [50].





RYCINA 8. Serce szczura z 16 doby życia płodowego. Przekrój poprzeczny na poziomie pnia tętniczego (a,b) oraz ujścia pnia płucnego na poziomie formującej się zastawki półksiężycowatej (c,d); (a i b oraz c i d) – pary skrawków sąsiednich. Lokalizacja angiopoetyny-1 (a) i angiopoetyny-2 (c); (b i d) – odczyn immunohistochemiczny z lektyną na sąsiadujących skrawkach tkankowych, celem pokazania rozmieszczenia naczyń w tych samych rejonach serca; a – aorta; p – pień płucny; pk – tkanka mezenchymatyczna zastawki półksiężycowatej pnia płucnego; grube strzałki – pokazują położenie wczesnych zwiążków naczyń w postaci wysp krwiotwórczych w pniu tętniczym; długie strzałki – tkankę mezenchymatyczną pnia płucnego z płatkami zastawki półksiężycowatej

Na temat udziału angiopoetyn w rozwoju naczyń w różnych narządach płodowych ukazały się prace wykorzystujące model zwierząt transgenicznych. Angiopoetyny są niezbędne do życia, ponieważ myszy pozbawione genu dla Ang-1 lub Ang-2 giną w okresie płodowym [47].

W sercach płodowych szczura angiopoetyna 1 (Ang-1) występuje przed waskularyzacją (ED12) i jest obecna podczas poszczególnych etapów angiogenezy płodowej (ED13-ED21), podobnie jak Ang-2. Występowanie obu angiopoetyn jest szczególnie silne w beleczkach serca, w miokardium gąbczastym podczas ED13 i 14. W beleczkach nie powstają wówczas żadne zawiązki naczyń. Same belecзки podlegają w ciągu następnego dnia rozwoju silnej przebudowie (skracaniu się) przy równoczesnym pogrubianiu się ściany miokardium zbitego. Ang-1 i Ang-2 są obecne na terenie komórek w sercu 13-dobowym. W następnym dniu rozwoju embrionalnego (ED15-16) immunohistochemiczne rozmieszczenie angiopoetyn pojawia się na terenie miokardium komór i przedsionków w postaci punktowych i/lub plamkowatych skupień (ryc. 8a,b). Skupienia te są charakterystycznym obrazem lokalizacji angiopoetyn w sercu do końca życia płodowego. Angiopoetyny nie występują w ścianie naczyń wieńcowych dużego kalibru, z rozwiniętą warstwą błony środkowej. Nie wykrywa się też angiopoetyn w ścianie pierwotnych naczyń zatokowych podnasierdza, które w tym okresie rozwoju nie wytwarzają błony środkowej (ryc. 8a,b,c,d). Badania ultrastrukturalne w mikroskopie elektronowym z użyciem techniki immunocytochemicznej wykazują, że angiopoetyna 1 jest obecna w przestrzeniach międzykomórkowych tworzącej się ściany naczyń w chwili przyłączania się nieśródbłonkowego składnika komórkowego (prekursora pericytu?, prekursora miocyta gładkiego?) do komórki śródbłonka. Z chwilą powstania ściślejszego połączenia między komórkami nie wykrywa się angiopoetyn w przestrzeni międzykomórkowej [63].

Każda z dwu angiopoetyn (Ang-1 i Ang-2) migruje w żelu poliakrylamidowym (12%) w warunkach redukujących jako dwie odmiany o masach cząsteczkowych około 55 i około 70 kDa. Istnienie dwu odmian angiopoetyn jest prawdopodobnie uwarunkowane różnym stopniem modyfikacji tych białek po translacji (np. różnice w ilości przyłączonych grup glikozylowych) [63].

Lokalizacja VEGF oraz jego ekspresja wykazuje zbieżność czasowo-przestrzenną z pojawianiem się zawiązków oraz właściwych naczyń wieńcowych. VEGF jest nieobecny w ścianie poduszczonek wsięrdziowych serca tam, gdzie nie powstają naczynia. Podobnie, Ang-1 i -2. Oba typy czynników wzrostu: Ang i VEGF mają podobną lokalizację w sercu embrionalnym, pokrywającą się z miejscami formowania się naczyń. Wydaje się jednak, że na poziomie submikroskopowym (molekularnym) wspomniane czynniki wzrostu działają w ściśle określonych przestrzennie i czasowo warunkach.

Zasadowy czynnik wzrostu (bFGF) odgrywa rolę pobudzającą na angiogenezę, lecz działa również stymulująco na wzrost innych typów komórek [13, 25], nie tylko komórek śródbłonka. Zbadano, że w systemie komórek śródbłonka hodowanych *in vitro* VEGF i bFGF działają synergistycznie na angiogenezę i tworzenie naczyń w żelu kolagenowym [26]. Udział tych czynników w rozwoju naczyń



wieńcowych nie jest do końca poznany, choć był przedmiotem niektórych badań [79, 81].

Ostatnie dane z badań nad rozwojem naczyń wieńcowych w modelu *in vitro* wskazują na udział wielu czynników wzrostu w regulacji tego procesu [82].

## CZYNNIKI HEMODYNAMICZNE

Rozpoczęcie przepływu krwi w systemie wieńcowym nie jest warunkiem niezbędnym do formowania się błony środkowej ściany naczynia w zawiązkach tętnic wieńcowych [62]. Początek przepływu krwi w naczyniach wieńcowych po udrożnieniu z aortą zwiększa naprężanie ścinające (ang. *shear stress*) komórek śródbłonna, co indukuje wyzwalamie pewnych substancji przez komórki śródbłonna naczyniowego [28, 37]. Substancje te modulują różnicowanie się miocytów gładkich błony środkowej oraz wpływają na ich proliferację [75]. Zwiększone naprężenie ścinające od strony tętniczych naczyń wieńcowych w porównaniu z naprężeniem w systemie naczyń żylnych (mniejsze ciśnienie krwi w naczyniach zatokowych żylnych naczyń wieńcowych) tłumaczy wcześniejsze różnicowanie się komórek mięśni gładkich tętnic wieńcowych w porównaniu z błoną środkową żył wieńcowych. W granicach spekulacji pozostaje natomiast sposób, w jaki jest indukowane powstawanie naczyń lub ich wzrostu do określonych miejsc w sercu przez przepływ krwi w jamach serca. Nie wiemy, czy np. tworzące się dwa strumienie krwi w jamach rozwijającego się serca mają wpływ na powstawanie i indukowanie wzrostu naczyń lub ich zawiązków w określonych miejscach serca.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AIKAWA E, KAWANO J. Formation of coronary arteries sprouting from the primitive sinus wall of the chick embryo. *Experientia* 1982; **38**: 816–818.
- [2] ALROY J, GOYAL V, SKUTELSKY E. Lectin histochemistry of mammalian endothelium. *Histochemistry* 1987; **86**: 603–607.
- [3] ANGELINI P. Normal and anomalous coronary arteries: definitions and classification. *Am Heart J* 1989; **117**: 418–434.
- [4] ANGELINI P. (red.) Coronary artery anomalies: a comprehensive approach. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins 1999.
- [5] ANVERSA P, OLIVETTI G, LOUD AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes. *Circ Res* 1980; **46**: 495–502.
- [6] ASAHARA T, CHEN D, TAKAHASHI T, FUJIKAWA K, KEARNEY M, MAGNER M, YANCOPOULOS GD, ISNER JM. Tie 2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1988; **83**: 223–240.
- [7] BEIGHLEY PE, THOMAS PJ, JORGENSEN SM, RITMAN EL. 3D architecture of myocardial microcirculation in intact rat heart: a study with micro-CT. *Adv Exp Med Biol* 1997; **430**: 165–175.
- [8] BENNETT HS. The development of the blood supply to the heart in the embryo-pig. *Am J Anat* 1936; **60**: 27–54.
- [9] BLAND-WHITE-GARLAND. (1933) - brak prac źródłowych, cyt. na podstawie: Kobielowa Z, Kucharzka K, Popezyńska-Markowa M, Sokotowska-Pituchowa J (1962) *Kardiolog Pol* 2:111 i Wiland-Žera A. *Postępy Kardiologii* (1957) 5: 93.

- [10] BOGERS AJJC, GITTENBERGER-DE GROOT AC, DUBBELDAM JA, HUYSMANS HS. The inadequacy of existing theories on development of the proximal coronary arteries and their connections with the arterial trunks. *Int J Cardiol* 1988; **20**: 117–125.
- [11] BOGERS AJJC, GITTENBERGER DE-GROOT AC, DUBBELDAM JA, HUYSMANS HA. Scanning electron microscopy substantiates histology in showing the inadequacy of the existing theories on the development of the proximal coronary arteries and their connections with the arterial trunks. *Acta Morphol Neerl-Scand* 1988/89; **26**: 225–237.
- [12] BOGERS AJJC, GITTENBERGER DE GROOT AC, POELMANN RE, PEAULT BM, HUYSMANS HA. Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol* 1989; **180**: 437–441.
- [13] BURGESS WH, MACIAG T. The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 575–606.
- [14] COFFIN JD, POOLE TJ. Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development* 1988; **102**: 735–748.
- [15] CONTE G, PELLIGRINI A. On the development of the coronary arteries in human embryos, stages 14–19. *Anat Embryol* 1984; **169**: 209–218.
- [16] DBALÝ J, OŠTÁDAL B, RYCHTER Z. Development of the coronary arteries in rat embryos. *Acta Anat* 1968; **71**: 209–222.
- [17] DBALÝ J, RYCHTER Z. The vascular system of the chick embryo. XVI. Development of branching of coronary arteries in chick embryo with experimentally induced right-half heart hypoplasia. *Folia Morphol (Prague)* 1966; **14**: 117–129.
- [18] DBALÝ J, RYCHTER Z. The vascular system of the chick embryo. XVII. Development of branching of coronary arteries in chick embryo with experimentally induced left-half heart hypoplasia. *Folia Morphol (Prague)* 1966; **14**: 117–129.
- [19] DAVIS S, ALDRICH TH, JONES PF, ACHESON A, COMPTON DL, JAIN V, RYAN TE, BRUNO J, RADZIEJEWSKI C, MAISONPIERRE PC, YANCOPOULOS GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; **87**:1161–1169.
- [20] DETTMAN RW, DENETCLAW W, ORDAHL CP, BRISTOW J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 1998; **193**: 169–181.
- [21] DERUITER MC, RENSEN SSM, COOLEN GPGM, HIERCK BP, BERGWERFF M, DEBIE WMH, GITTENBERGER-DE GROOT AC, VAN EYS GJJ. Smoothelin expression during chicken embryogenesis: detection of an embryonic isoform. *Dev Dyn* 2001; **221**: 460–463.
- [22] DEVRIES C, ESCOBEDO JA, UENO H, HOUCK K, FERRARA N, WILLIAMS LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; **255**: 989–991.
- [23] DUMONT DJ, GRADWOHL G, FONG G-H, PURI MC, GERSTENSTEIN M, AUERBACH A, BREITMAN ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 1994; **8**:1897–1909.
- [24] FERRARA N, HENZEL WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**: 851–855.
- [25] GOSPODAROWICZ D, ABRAHAM JA, SCHILLING J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7311–7315.
- [26] GOTO F, GOTO K, WEINDEL K, FOLKMAN J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; **69**: 508–517.
- [27] HAMBURGER V, HAMILTON HL. A series of normal stages in the development of the chick embryos. *J Morphol* 1951; **88**: 49–92.
- [28] HANNAN RL, KOUREMBANAS S, FLANDERS KC, ROGELJ SJ, ROBERTS AB, FALLER DV, KLAGSBRUN M. Endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Growth Factors* 1988; **1**: 7–17.
- [29] HANSEN-SMITH FM, WATSON L, LU DY, GOLDSTEIN I. *Griffonia simplicifolia* 1: fluorescent tracer for microcirculatory vessels in nonperfused thin muscles and sectioned muscle. *Microvasc Res* 1988; **36**: 199–215.
- [30] HASHIMOTO E, OGITA T, NAKAOKA T, MATSUOKA R, TAKAO A, KIRA Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 1994; **267**: H1948–H1954.
- [31] HEINZBERGER CFM. Development of myocardial vascularization in the rat. *Acta Morphol Neerl-Scand* 1983; **21**: 267–284.
- [32] HIRUMA T, HIRAKOW R. Epicardial formation in embryonic chick heart: computer-aided reconstruction, scanning, and transmission electron microscopic studies. *Am J Anat* 1989; **184**: 129–138.



- [33] HOOD LC, ROSENQUIST TH. Coronary artery development in the chick: origin and deployment of smooth muscle cells, and the effects of neural cell ablation. *Anat Rec* 1992; **234**: 291–300.
- [34] HUANG YQ, LI JJ, KARPATKIN S. Identification of a family of alternatively spliced mRNA species of angiopoietin-1. *Blood* 2000; **95**:1993–1999.
- [35] HUNGERFORD JE, LITTLE CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* 1999; **36**: 2–27.
- [36] HUTCHINS GM, KESSLER-HANNA A, MOORE GW. Development of the coronary arteries in the embryonic human heart. *Circulation* 1988; **77**: 1250–1257.
- [37] JOSEPH-SILVERSTEIN J, RIFKIN DB. Endothelial cell growth factors and the vessel wall. *Semin Thromb Hemostasis* 1987; **13**: 504–513.
- [38] KÁLMÁN F, VIRÁGH S, MÓDIS L. Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. *Anat Embryol* 1995; **191**: 451–464.
- [39] KRÄMER J, AGUIRRE-ARTETA AM, THIEL C, GROSS CM, DIETZ R, CARDOSO MC, LEONHARDT H. A novel isoform of the smooth muscle cell differentiation marker smoothelin. *J Mol Med* 1999; **77**: 294–298.
- [40] KRÄMER J, QUENSEL C, MEDING J, CARDOSO MC, LEONHARDT H. Identification and characterization of novel smoothelin isoforms in vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 2001; **38**: 120–132.
- [41] KUHN H-J, LIEBHERR G. The early development of the epicardium in *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol* 1988; **177**: 225–234.
- [42] KWEE L, BALDWIN HS, MIN SHEN H, STEWART CL, BUCK C, BUCK CA, LABOW MA. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) – deficient mice. *Development* 1995; **121**: 489–503.
- [43] LEE YM, JEONG CH, KOO SY, SON MJ, SONG HS, BAE SK, RALEIGH JA, CHUNG HY, YOO MA, KIM KW. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos *in vivo*: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn* 2001; **220**:175–186.
- [44] LEUNG DW, CACHIANES G, KUANG WJ, GOEDEL DV, FERRARA N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; **246**:1306–1309.
- [45] LEWIS FT. The question of sinusoids. *Anat Anz* 1904; **25**: 261–279.
- [46] LICATA RH. Human embryonic heart in the ninth week. *Am J Anat* 1954; **94**: 73–125.
- [47] MAISONPIERRE PC, SURI C, JONES PF, BARTUNKOVA S, WIEGAND SJ, RADZIEJEWSKI C, COMPTON D, MCCLAIN J, ALDRICH TH, PAPADOPOULOS N, DALY TJ, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; **277**: 55–60.
- [48] MANASEK FJ. Embryonic development of the heart. I A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. *J Morphol* 1968; **125**: 329–366.
- [49] MANDARIM-DE-LACERDA CA. Development of the coronary arteries in staged human embryos (The Paris Embryological Collection Revisited). *Ann Acad Bras Ci* 1990; **62**: 79–84.
- [50] MANDRIOTA SJ, PEPPER MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokine and hypoxia. *Circ Res* 1998; **83**: 852–859.
- [51] MEZQUITA J, MEZQUITA B, PAU M, MEZQUITA C. Characterization of a novel form of angiopoietin-2 (Ang-2B) and expression of VEGF and angiopoietin-2 during chicken testicular development and regression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **260**: 492–498.
- [52] MIKAWA T, FISCHMAN DA. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9504–9508.
- [53] MIKAWA T, GOURDIE RG. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 1996; **174**: 221–232.
- [54] NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; **13**: 9–22.
- [55] OŠTÁDAL B, SCHIEBLER TH, RYCHTER Z. Relations between the development of the capillary wall and the myoarchitecture of the rat heart. *Adv Exp Med Biol* 1975; **53**: 375–388.
- [56] OWENS GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; **75**: 487–517.
- [57] PARDANAUD L, ALTMANN C, KITOS P, DIETERLEN-LIČVRE F, BUCK CA. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 1987; **100**: 339–349.
- [58] PETERS KG. Vascular endothelial growth factor and the angiopoietins. Working together to build a better blood vessel. *Circ Res* 1998; **83**: 342–343.
- [59] POELMANN RE, GITTENBERGER-DE GROOT AC, MENTINK MMT, BÖKENKAMP R, HOGERS B. Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 1993; **73**: 559–568.

- [60] PURI MC, ROSSANT J, ALITALO K, BERNSTEIN A, PARTANEN J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 1995; **14**: 5884–5891.
- [61] RATAJSKA A, TORRY RT, KITTEN GT, KOLKER SJ, TOMANEK RJ. Modulation of cell migration and vessel formation by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in cultured embryonic heart. *Dev Dyn* 1995; **203**: 399–407.
- [62] RATAJSKA A, FIEJKA E. Prenatal development of coronary arteries in the rat: morphologic pattern. *Anat Embryol* 1999; **200**: 533–540.
- [63] RATAJSKA A, MYKA M, FIEJKA E, JÓZKOWICZ A, DULAK J. Expression of angiopoietins (-1 and -2) in embryonic rat hearts during coronary vessel development. [w] „Cardiac Development”, Ošťádal B, Nagano M, Dhalla NS - wyd., Kluwer Academic Publishers, Boston, 2002, 33–44.
- [64] RATAJSKA A, FIEJKA E, SIEMIŃSKA J. Prenatal development of coronary arteries in the rat: morphometric patterns. *Folia Morphol* 2000; **59**: 297–306.
- [65] RATAJSKA A, ŹARSKA M, QUENSEL C, KRÁMER J. Differentiation of the smooth muscle cell phenotypes during embryonic development of coronary vessels in the rat. *Histochem Cell Biol* 2001; **116**: 79–87.
- [66] RISAU W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995; **9**: 926–933.
- [67] RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; **386**: 671–674.
- [68] RONGISH BJ, TORRY RJ, TUCKER DC, TOMANEK RJ. Neovascularization of embryonic rat hearts cultured *in oculo* closely mimics *in utero* coronary vessel development. *J Vasc Res* 1994; **31**: 205–221.
- [69] RYCHTER Z, OŠTÁDAL B. Mechanism of the development of coronary arteries in chick embryo. *Folia Morphol* (Prague) 1971; **19**: 113–124.
- [70] SATO TN, TOZAWA Y, DEUTSCH U, WOLBURG-BUCHHOLTZ K, FUJIWARA Y, GENDRON-MAGUIRE M, GRIDLEY T, WOLBURG H, RISAU W, QIN Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinase Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; **376**: 70–74.
- [71] SCHLAEGER TM, QIN Y, FUJIWARA Y, MAGRAM J, SATO TN. Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development* 1995; **121**: 1089–1098.
- [72] SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D, KESHET E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; **359**: 843–845.
- [73] SENGER DR, GALLI SJ, DVORAK AM, PERRUZZI CA, HARVEY VS, DVORAK HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; **219**: 983–985.
- [74] SEMENZA GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; **15**: 551–578.
- [75] STERPETTI AV, CUCINA A, D'ANGELO LS, CARDILLO B, CAVALLARO A. Shear stress modulates the proliferation rate, protein synthesis, and mitogenic activity of arterial smooth muscle cells. *Surgery* 1993; **113**: 691–699.
- [76] SURI C, JONES PF, PATAN S, BARTUNKOVA S, MAISONPIERRE PC, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; **87**: 1171–1180.
- [77] TERMAN BI, DOUGHER-VERMAZEN M, CARRION ME, DIMITROV D, ARMELLINO DC, GO-SPODAROWICZ D, BOHLEN P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1579–1586.
- [78] TISCHER E, GOSPODAROWICZ D, MITCHELL R, SILVA M, SCHILLING J, LAU K, CRISP T, FIDDES JC, ABRAHAM JA. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **165**: 1198–1206.
- [79] TOMANEK RJ, HAUNG L, SUVARNA PR, O'BRIEN LC, RATAJSKA A, SANDRA A. Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res* 1996; **31**: E116–E126.
- [80] TOMANEK RJ, RATAJSKA A. Vasculogenesis and angiogenesis in the developing heart. W: Burggren WW, Keller BB [wyd.] Development of the Cardiovascular systems. Molecules to Organisms. Cambridge University Press, 1997: 35–42.
- [81] TOMANEK RJ, RATAJSKA A, KITTEN GT, YUE X, SANDRA A. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Dyn* 1999; **215**: 54–61.
- [82] TOMANEK RJ, ZHENG W, PETERS KG, LIN P, HOLIFIELD JS, SUVARNA PR. Multiple growth factors regulate coronary embryonic vasculogenesis. *Dev Dyn* 2001; **221**: 265–273.
- [83] VAN DER LOOP FTL, SCHAART G, TIMMER EDJ, RAMAEKERS FCS, VAN EYS GJJM. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1996; **134**: 401–411.
- [84] VAN DER LOOP FTL, GABBIANI G, KOHNEN G, RAMAEKERS FCS, VAN EYS GJJM. Differentiation of smooth muscle cells in human blood vessels as defined by smoothelin, a novel marker for the contractile phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 665–671.



- [85] VALENZUELA DM, GRIFFITHS JA, ROJAS J, ALDRICH TH, JONES PF, ZHOU H, MCCLAIN J, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, HUANG T, PAPADOPOULOS N, MAISSONPIERRE PC, DAVIS S, YANCOPOULOS GD. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1904–1909.
- [86] VECCHI A, GARLANDA C, LAMPUGNANI MG, RESNATI M, MATTEUCCI C, STOPPACCIARO A, SCHNURCH H, RISAU W, RUCO L, MANTOVANI A, DEJANA E. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 1994; **63**: 247–254.
- [87] VIRÁGH S, CHALLICE CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 1981; **201**: 157–168.
- [88] VIRÁGH S, GITTEBERGER-DE GROOT AC, POELMANN RE, KÁLMÁN F. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol* 1993; **188**: 381–393.
- [89] VIRÁGH S, KÁLMÁN F, GITTEBERGER-DE GROOT AC, POELMANN RE, MOORMAN AFM. Angiogenesis and hematopoiesis in the epicardium of the vertebrate embryo heart. [w] „Embryonic origins of defective heart development”, Bockman DE, Kirby ML [wyd.] *Ann NY Acad Sci USA* 1990; **588**: 455–458.
- [90] VOBOŘIL Z, SCHIEBLER TH. Über die Entwicklung der Gefäßversorgung des Rattenherzens. *Z Anat Entwickl Gesch* 1969; **129**: 24–40.
- [91] VRANCKEN PEETERS MPFM, GITTEBERGER-DE GROOT AC, MENTINK MMT, HUNGERFORD JE, LITTLE CD, POELMANN RE. Differences in development of coronary arteries and veins. *Cardiovasc Res* 1997; **36**: 101–110.
- [92] VRANCKEN PEETERS MPFM, GITTEBERGER-DE GROOT AC, MENTINK MMT, HUNGERFORD JE, LITTLE CD, POELMANN RE. The development of the coronary vessels and their differentiation into arteries and veins in the embryonic quail heart. *Dev Dyn* 1997; **208**: 338–348.
- [93] VRANCKEN PEETERS MPFM, GITTEBERGER-DE GROOT AC, MENTINK MMT, POELMANN RE. Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol* 1999; **199**: 367–378.
- [94] VRANCKEN PEETERS MPFM, MENTINK MMT, POELMANN RE, GITTEBERGER-DE GROOT AC. Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anat Embryol* 1995; **191**: 503–508.
- [95] WALDO KL, WILLNER W, KIRBY ML. Origin of the proximal coronary artery stems and a review of ventricular vascularization in the chick embryo. *Am J Anat* 1990; **188**: 109–120.
- [96] YANG JT, RAYBURN H, HYNES RO. Cell adhesion events mediated by  $\alpha 4$  integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 1995; **121**: 549–560.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 25.01.2002 r.

Przyjęto: 20.03.2002 r.

Adres autora: ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa

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

## ERRATA

Errata do artykułu: **Kucia M., Drukała J.:** Postęp w metodach hodowli komórek dla transplantologii Komórki macierzyste. *Post Biol Kom* 2002; 29: 257–268.

Zdanie umieszczone na str. 261 w. 3 od góry w brzmieniu:

Maksymalnie cztery dni po zapłodnieniu i kilku cyklach podziałowych totipotencjalne komórki zaczynają procesy specjalizacji prowadzące do utworzenia kulistej blastocysty, w której można wyróżnić zewnętrzną warstwę komórek tworzących blastodermę i grupę komórek nazywaną węzłem zarodkowym lub wewnętrzną masą komórkową (ICM – ang. *inner cell mass*). Komórki węzła zarodkowego biorą udział w tworzeniu łożyska oraz tkanek wspomagających rozwój zarodka.

**Powinno brzmieć następująco:**

Maksymalnie cztery dni po zapłodnieniu i kilku cyklach podziałowych totipotencjalne komórki zaczynają procesy specjalizacji prowadzące do utworzenia kulistej blastocysty, w której można wyróżnić zewnętrzną warstwę komórek i grupę komórek nazywaną węzłem zarodkowym lub wewnętrzną masą komórkową (ICM – ang. *inner cell mass*). Komórki blastocysty biorą udział w tworzeniu łożyska oraz tkanek zarodka.



## Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

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

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 2002 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	100,00	120,00	150,00	200,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

## Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

### *Prenumerata na rok 2003*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2003 pod adresem:  
 FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)  
 na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,  
 IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2003:  
 dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,  
 dla odbiorców indywidualnych 50 zł.

### *Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2003*

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of  
 POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,  
 tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl):

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,  
 IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA

122

THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE

THE JOURNAL OF THE





## 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 (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać 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. 160) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy; w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Barwne ryciny i zdjęcia są płatne. Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszt publikacji artykułu w „Postęпах” wynosi 300,- zł za artykuł. 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. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin

Treść pracy nie była uprzednio publikowana, **tak nie** nie została wysłana do innej redakcji **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę Jest zgodna osoba, których informacje nie-

Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego

publikowane są zamieszczone w tekście Odpowiadam za całość pracy

**tak nie** z komputera IBM **tak nie**

„Postęпах Biologii Komórki” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w

*podpisy wszystkich autorów*



---

TREŚĆ – CONTENTS

W tym zeszycie PBK	363
CIERNIAK A, KAPISZEWSKA M.:Metoda mikrojąder w badaniach epidemiologicznych The micronucleus technique in epidemiological studies	365
WOJTKOWSKA M: Import białka do mitochondriów Protein import into mitochondria	379
BRYŁA M: Molekularne aspekty klonowania somatycznego zwierząt Molecular aspects of somatic cloning in animals	399
WOJCIECHOWSKA M., NIEMIAŁTOWSKI M.:Rola makrofagów w układzie rozrodczym ssaków: od Paula Ehrlicha do współczesnej immunologii rozrodu The role of macrophages in mammals reproductive tract: from Paul Ehrlich to present immunology of reproduction	409
ORŁOWSKI D., SOŁTYS Z.:Analiza fraktalna kształtu komórek Fractal analysis of cells shape	423
POWAŁOWSKI S., GULEWICZ P., GRAJEK W.: Wpływ ciśnienia osmotycznego na stan fizjologiczny komórek bakteryjnych Influence of osmotic pressure on physiological condition of bacterial cells	435
KUKULSKI F., KOMOSZYŃSKI M.:E-NTPDazy – enzymy uczestniczące w procesach sygnalizacji w centralnym układzie nerwowym E-NTPDases – enzymes involved in signalling processes in the central nervous system	449
BASAK G., LASEK W.:Eksperymentalne i kliniczne próby leczenia nowotworów z użyciem genu dla interleukiny 12 (IL-12) Experimental and clinical application of interleukin 12 (IL-12) – Gene-based therapy in tumour treatment	465
DEPTAŁA A., NURZYŃSKA D., DARŻYŃKIEWICZ Z., JĘDRZEJCZAK W. W.: Rola białek z rodziny Rel/NFκB/IκB w patogenezie nowotworów The role of Rel/NFκB/IκB proteins in the pathogenesis of cancer	487
RATAJSKA A.: Rozwój osobniczy naczyń wieńcowych oraz niektóre zagadnienia jego regulacji Embryonic development of coronary vessels and some mechanisms of its regulation	503
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK oraz Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	527
Errata	528