

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 30, ISSUE 1/2003
(1-216)

Postępy Biologii Komórki

Advances in Cell Biology

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

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

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

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii 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. Chalubińskiego 6a*

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

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

- Wyciszanie RNA jest procesem, w którym dochodzi do degradacji w komórkach roślin wybranych cząsteczek RNA. Mechanizm ten odgrywa kluczową rolę w dwóch niezwykle ważnych dla roślin procesach: w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów i w obronie roślin przed infekcją wirusów. W identyfikacji właściwych do degradacji cząsteczek RNA biorą udział krótkie fragmenty RNA o długości 21–25 nukleotydów oraz roślinna rybonukleaza. Więcej na ten temat znajdzie Czytelnik na stronie 75 tego Zeszytu.
- Na stronie 167–186 są dyskutowane DNA i białka centromerowe. Wspólną cechą dotąd zbadanych DNA centromerowych jest obecność układów tandemowych. Pewne ogólne podobieństwo sekwencji centromerowego DNA stwierdza się w rządzie naczelných, a także u spokrewnionych gatunków roślin wyższych.
- Kaspazy są egzekutorami procesu programowanej śmierci komórki. Za opisanie regulacji genetycznej tego procesu Nagrodę Nobla z Fizjologii i Medycyny w roku 2002 otrzymali Sydney Brenner, Robert Horowitz i John E. Sulston. Może również dlatego warto zajrzeć na stronę 129 tego zeszytu, gdzie podsumowano osiągnięcia badań nad mechanizmami aktywacji, głównymi substratami kaspaz i regulacją ich aktywności..
- Komórki wątroby pełnią różne funkcje, co wiąże się też z ich lokalizacją. Na stronie 47 rozpoczyna się dwuczęściowy artykuł o roli komórek gwiaździstych w regulacji funkcji wątroby.



WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 29 Z ROKU 2002
REFEREES OF THE VOLUME 29, 2002

Prof. dr hab. Lucyna Antkiewicz-Michaluk
Prof. dr hab. Szczepn Biliński
Prof. dr hab. Zofia Błach-Olszewska
Prof. dr hab. Maria Charzyńska
Prof. dr hab. Mieczysław Chraży
Prof. dr hab. Andrzej Dżugaj
Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak
Prof. dr hab. Mirosława Furmanowa
dr Grażyna Hoser
Prof. dr hab. L. Hryniewiecka
Prof. dr hab. Danuta Hulanicka
Prof. dr hab. Krystyna Janas
Prof. dr hab. Józef Kałuża
Prof. dr hab. Jerzy Kawiak
Prof. dr hab. Andrzej K. Konowonicz
dr Anna Korzyńska
Prof. dr hab. Zbigniew Krupa
Prof. dr hab. Halina Krzanowska
Prof. dr hab. Anna Latos-Bieleńska
Prof. dr hab. Stanisław Lewak
Prof. dr hab. Jerzy Liebhart
Prof. dr hab. Maria Malicka-Błaszkiwicz
Prof. dr hab. Jolanta Małuszyńska
Prof. dr hab. Jerzy Nowak
Prof. dr hab. Maria Olszewska
Prof. dr hab. Regina Osiecka
Prof. dr hab. Zofia Osuchowska
Prof. dr hab. Barbara Płytycz
Prof. dr hab. Lech Ratajczak
Prof. dr hab. Danuta Rożyńkowa
Doc. dr hab. Bogusław Sawicki
Prof. dr hab. J. Selmaj
Prof. dr hab. Ryszard Słomski
Prof. dr hab. Jerzy Stachura
Prof. dr hab. Zofia Starck
Prof. dr hab. Piotr Stępień
Doc. dr hab. Tomasz Stokłosa
Prof. dr hab. Kazimierz Strzałka
Prof. dr hab. Adam Szewczyk
Prof. dr hab. Irena Szumiel
Prof. dr hab. Maciej Ugorski
Prof. dr hab. Maciej Zabel
Prof. dr hab. Jan Żeromski

PROFESOR MIROSLAW MOSSAKOWSKI: NEUROBIOLOG – INTUICJONISTA I WIZJONER WSPOMNIENIE

IN MEMORIAM: PROFESSOR MIROSLAW MOSSAKOWSKI
A NEUROBIOLOGIST WITH INTUITION AND VISION

Jan ALBRECHT

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

Streszczenie: Niniejszy artykuł poświęcony jest osiągnięciom naukowym Profesora Mirosława Mossakowskiego, zmarłego rok temu wybitnego neurobiologa-neuropatologa, wieloletniego dyrektora Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, od 1998 r. do chwili śmierci Prezesa Polskiej Akademii Nauk. Przytoczone fakty z życia naukowego Profesora, uzupełnione refleksjami z kontaktów osobistych oraz odniesieniami do aktualnego stanu wiedzy w dziedzinach zainteresowania Profesora, a na tym tle osiągnięć badawczych Jego uczniów, dokumentują Jego niezwykłą intuicję naukową, a szczególnie dar przewidywania przyszłościowych kierunków badań nad fizjologią i patologią mózgu.

Słowa kluczowe: mózg, astrocyty, niedokrwienie, niedotlenienie, encefalopatia wątrobowa, biosynteza białek.

Summary: The present paper is devoted to the scientific achievements of Professor Mirosław Mossakowski, a leading figure in neuropathology and neuroscience who passed away a year ago. Professor Mossakowski was Director of the Medical Research Centre of the Polish Academy of Sciences for more than a quarter of a century, and held the post of a President of the Academy from 1998 until his last days. Facts from his professional life are presented in the context of the up-to-date state of the art of the areas of his interest and of the achievements of his scholars, and painted with the authors' experiences derived from the personal contacts with his mentor. The treatise is aimed at documenting Prof. Mossakowski's extraordinary intuition in various areas of neurobiology, in particular his gift to foresee the future lines of research on the physiology and pathology of the central nervous system.

Key words: brain, astrocytes, ischemia, hypoxia, hepatic encephalopathy, protein biosynthesis.

W dniu 26 grudnia ubiegłego roku odszedł Profesor Mirosław Mossakowski. Był wybitnym neurobiologiem, jednym z rzadkich w dzisiejszych czasach przedstawicieli społeczności naukowej, których najkrótsza charakterystyka mieści się w pełni w sformułowaniu „postać renesansowa”. W czasach, gdy skuteczność drogi życiowej utożsamia się z zawężaniem i skracaniem szlaków ekspansji i pola widzenia, Profesor jako jeden z nielicznych łączył w sobie cechy wybitnego uczonego, organizatora i animatora nauki, menedżera i męża stanu. W ogólnej świadomości społecznej najsilniej zaakcentowały się jego rozliczne funkcje animacyjno-kierownicze. Przez ponad 25 lat był dyrektorem Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN – instytutu, który stworzył od podstaw i który w maju br. został na Jego cześć przemianowany na Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego. Od przeszło 20 lat pełnił wysokie funkcje w Polskiej Akademii Nauk: od 1998 r. do chwili śmierci był jej prezesem, a w różnych okresach przewodził rozlicznym krajowym i zagranicznym stowarzyszeniom naukowym. Te strony działalności Profesora były wielokrotnie przedmiotem doniesień w środkach masowego komunikowania oraz osobistych wywiadów radiowych i telewizyjnych, których chętnie i ze swadą udzielał. Ci, którzy Go znali, mieli możliwość podziwiać Jego twórczą energię i pozytywne myślenie we wszystkich tych obszarach.

Niniejsze refleksje poświęcono wyłącznie działalności naukowej Profesora. Tekst nie pretenduje do miana rejestru Jego osiągnięć badawczych: Przytoczone fakty, uzupełnione echem z kontaktów osobistych, mają dokumentować jego niezwykłą intuicję, a w szerszym wymiarze – dar przewidywania kierunków, w jakich rozwiną się badania nad fizjologią i patologią mózgu.

Zmaterializowaniu się i ukształtowaniu przymiotów badacza sprzyjała gruntowna wiedza, którą Profesor zdobył pod kierunkiem wybitnych mistrzów w kraju i za granicą: fakt, iż znalazł się pod ich skrzydłami, sam w sobie daje świadectwo wyczuciu okoliczności najlepiej sprzyjających rozwojowi osobowości twórczej. Po ukończeniu studiów na Wydziale Lekarskim AM w Gdańsku w 1953 r. przeniósł się do Warszawy, gdzie odbył studia doktoranckie w Zakładzie Histopatologii Ośrodkowego Układu Nerwowego pod kierownictwem prof. Adama Opalskiego, jednego z pionierów badań nad patomorfologią gleju. Zakład ten w niedługim czasie przekształcił się w Zakład Neuropatologii, a w nim Profesor zorganizował *ex nihilo* pierwszą w Polsce i jedną z pierwszych w Europie Pracownię Hodowli Komórek O.U.N.

We wczesnym okresie pasję doświadczalną łączył z pracą kliniczną w renomowanym oddziale: I. i II. stopień specjalizacji z neurologii zdobywał pod kierunkiem pani prof. Ireny Hausmanowej-Petrusewicz. W 1959 roku dobra intuicja powiodła go za ocean, na roczny staż do Instytutu Neurologii w Montrealu, gdzie bezpośrednio zetknął się i współpracował z ojcem nowoczesnej neuropatologii, Williamem Penfieldem. W kilka lat później przebywał w Narodowym Instytucie Zdrowia w Bethesdzie, gdzie współpracował z dr. Igorem Klatzo, jednym z największych wizjonerów współczesnej neuropatologii, którego nazwisko wiąże się m. in. ze sformułowaniem definicji wazogennej i cytotoksycznego obrzęku mózgu oraz zjawiska dojrzewania poniedokrwiennego uszkodzenia tkanek ośrodkowego układu nerwowego [12].

W swoich badaniach doświadczalnych Profesor od początku skupił się na systematycznym, szczegółowym opisywaniu zmian morfologicznych, histochemicznych i histoenzymatycznych obrazujących trzy grupy stanów patologicznych ośrodkowego układu nerwowego: niedotlenienia i niedokrwienia, encefalopatii pochodzenia wątrobowego związanych z toksycznym działaniem amoniaku oraz guzów mózgu. Wspólnym przedmiotem zainteresowania Profesora w obrębie tych stanów patologicznych był los komórek gleju gwiaździstego, prościej astrocytów. Były to czasy, gdy komórki te, stanowiące przeszło 25% masy i 50% objętości mózgu, nadal postrzegano wedle wzorca stworzonego przez wielkich z przeszłości (Virchowa, Golgiego, Cajala) – jako bierne podścielisko, w najlepszym razie fizyczną podporę aktywnie przewodzących neuronów: mało komu przychodziło wówczas do głowy, iż komórki te są aktywnym partnerem neuronu, a wiarygodnych dowodów biochemicznych czy elektrofizjologicznych na interakcję neuron-astrocyt praktycznie nie było. Taki kaleki, dyskredytujący astrocyty obraz funkcji mózgu fałszował rozumienie istoty szeregu schorzeń O.U.N. Dotyczyło to zwłaszcza encefalopatii wątrobowej, gdzie jak wiadomo od dawien dawna, zmiany morfologiczne omijają neurony, a dotyczą astrocytów (dane w ujęciu historycznym przytoczono w kilku artykułach przeglądowych, por. m.in. [3,18]). Poglądy na to schorzenie cechowała delikatnie rzecz ujmując mało twórcza dwoistość widzenia – neurofizjolodzy i klinicyści postrzegali je jako pierwotne zaburzenie funkcji neuronu, traktując zmienione astrocyty jako mechanistycznie nieistotny odprysk, patomorfologowie zaś jako chorobę astrocytów, której towarzyszą niewytłumaczalne zaburzenia neurofizjologiczne. Profesor Mossakowski był pierwszym badaczem, któremu udało się znaleźć *iunctim* między tymi punktami widzenia, co zostało opublikowane w 1970 roku w *Acta Neuropathologica* [16]. Dowiódł, iż typowy dla encefalopatii wątrobowej przebieg transformacji astrocytów można odtworzyć *in vitro* traktując organotypowe hodowle różnych okolic mózgu szczura (mózdzku, hipokampa) amoniakiem bądź surowicą od chorych z encefalopatią wątrobową; okazało się zatem, iż odpowiedzialny za objawy schorzenia amoniak działa bezpośrednio na astrocyty. Nawiasem mówiąc, w pracy tej oddał hołd swojemu pierwszemu nauczycielowi – wśród zmienionych astrocytów dostrzegł tzw. komórki Opalskiego. Praca ta ukazała się o 9 lat wcześniej niż uważana za przełomową publikacja Michaela Norenberga, w której autor ten dowiódł, iż syntetaza glutaminowa – enzym neutralizujący nadmiar amoniaku w mózgu jest wybiórczo zlokalizowany w astrocytach [19]. W innej pracy, pozornie niezwiązanej z tematem, Profesor Mossakowski poszedł o krok dalej: stosując rutynowe metody histochemiczne wykazał, iż zahamowanie aktywności enzymów cyklu Krebsa wywołuje zmiany morfologiczne w astrocytach przypominające te, które towarzyszą encefalopatii wątrobowej [20]. Była to pierwsza obserwacja wskazująca na możliwy związek zaburzeń metabolizmu energetycznego astrocytów z encefalopatią hiperamonemiczną: Praca ta ukazała się blisko 20 lat przed pojawieniem się danych dokumentujących bezpośredni hamujący wpływ amoniaku i encefalopatii wątrobowej na aktywność dehydrogenazy alfa-ketoglutaranu w mózgu [11,13].

Dziś wiemy, iż zgromadzony w astrocytach glikogen stanowi rezerwę energetyczną ostatniej szansy dla niedotlenionych lub wygłodzonych substratowo neuronów, od kilku lat znamy dokładnie odneuralny, receptorowy mechanizm pobudzenia degradacji glikogenu w astrocytach i mechanizm transportu tak uzyskanej glukozy do neuronów [8, 22]. Warto jednak odnotować, iż to właśnie wspólnemu wysiłkowi tandemu Mossakowski-Klatzo zawdzięczamy pierwszy opis zmian w aktywności enzymów metabolizujących glikogen w mózgu w warunkach niedotlenienia [17].

Nie sposób przytoczyć wszystkich oryginalnych, nowatorskich spostrzeżeń poczynionych przez Profesora na przestrzeni dziesięcioleci. Niewątpliwie zainspirował, a w dużej mierze wykreował kilka kierunków badawczych we własnym instytucie. Badania prowadzone przez Jego uczniów wniosły znaczący wkład w zrozumienie mechanizmu zaburzeń funkcjonowania mózgu w warunkach jego niedotlenienia i niedokrwienia, na poziomie komórkowym i molekularnym. Do najistotniejszych osiągnięć w tej dziedzinie zaliczyć należy wykazanie uszkadzającego wpływu nadmiernego wnikania jonów wapnia do komórek nerwowych (Jerzy Łazarewicz [14]) oraz aktywacji w tych warunkach wielu układów przekąźników wewnątrzkomórkowych, w tym kinazy białkowej C (Krystyna Domańska-Janik [9]), tlenku azotu (Joanna Strosznajder [7]), jak również czynników transkrypcyjnych (Domańska-Janik [10]). W obszarze badań nad rolą astrocytów w patologii ośrodkowego układu nerwowego na uwagę zasługuje opis wybiórczej wrażliwości tych komórek na uszkodzenie przez kwas kainowy, modelowy związek ekscytotyczny będący agonistą receptorów kwasu glutaminowego (Ewa Matyja [15]). Autor niniejszego opracowania przejął po Profesorze pałeczkę badań nad szlakiem dokumentującym rolę tych komórek w ujawnianiu się neurotoksyczności amoniaku i patomechanizmie encefalopatii wątrobowej (badania cytowane w artykule przeglądowym [3]).

Niech mi wolno będzie dodatkowo udokumentować tezę o przenikliwej intuicji badawczej Profesora i jego niepospolitej zdolności kojarzenia obserwacji kilkoma wspomnieniami osobistymi. Pierwsze przypadkowe zetknięcie autora artykułu z Profesorem nastąpiło w niebanalnym czasie i miejscu: przeszło 35 lat temu, w okresie Wielkiej Nocy, w Paryżu, w drzwiach wejściowych Ośrodka PAN na Rue Lauriston. Profesor zatrzymał się tam w drodze powrotnej ze stażu w Bethesda. Do dziś pamiętam, iż w trakcie rozmowy zwierzyłem się, że tematem pracy doktorskiej, którą właśnie zacząłem przygotowywać na Uniwersytecie w Lejdzie, jest mechanizm inicjacji biosyntezy białka u bakterii (*E. coli*). Profesor zareagował w sposób zdumiewający, a o tym, że reakcja była zwykłym świadectwem jego niezwyklej wyobraźni naukowej, przekonałem się kilka lat później. Powiedział mniej więcej coś takiego: „Wie Pan, ta inicjacja skoro tak istotna dla bakterii, to musi być również czynnikiem determinującym intensywność syntezy białka w mózgu, a jeśli tak, to jest prawdopodobnie bardzo wrażliwa na czynniki uszkadzające mózg...Jak Pan skończy swoje wojaże, to niech Pan się do mnie zgłosi, zatrudnię Pana w Centrum...”. Proszę zwrócić uwagę na czas, w którym zostały wypowiedziane te słowa: rok 1967, wiedza o mechanizmie biosyntezy białka w tkankach zwierzęcych była wówczas w powijakach, szczegółowego opisu funkcjonowania czynników inicjujących w organizmach wyższych doczekaliśmy się

dopiero 8 lat później [4]. Wszakże nietrudno było domniemywać, iż podobnie jak u bakterii, tak i u eukariotów reakcja inicjacji musi być ATP-zależna, ale w końcu niewiele procesów można zainicjować bez dostarczenia ATP. Pięć lat po wypowiedzi Profesora piszący te słowa opublikował dane świadczące o wybiórczej wrażliwości inicjacji syntezy białka w mózgu na niedotlenienie w modelu zatrucia tlenkiem węgla [1], dokładnie tak, jak to przewidział Profesor.

Wiele lat później, w 1984 roku, zauważyliśmy, iż umiarkowana hiperamonemia prowadzi do aktywacji anhidrazy węglanowej w mózgu [2]. W owych czasach obserwacja ta nie kwalifikowała się do racjonalnego wytłumaczenia. Pamiętam do dziś, jak Profesor z charakterystycznym przenikliwym półśmiechem kręcił głową nad wynikami, długo nic nie mówił i nagle: „... Panie, to jakaś zmiana pH w astrocytach...” ... Było to tuż przed ukazaniem się pracy grupy Shanka, w której wykazano, że anaplerotyczne wiązanie dwutlenku węgla z kwaśnego węglanu w cyklu reakcji katalizowanych przez anhidrazę węglanową i karboksylazę pirogronianową jest procesem zachodzącym głównie w astrocytach [21], zaś 9 lat przed tym, jak Boron i współpracownicy dowiedli, iż amoniak indukuje w pojedynczych astrocytach skoki pH [5], a 16 lat musiało upłynąć do czasu, gdy Neville Brookes opracował na podstawie wyników żmudnych badań schemat łączący indukowane przez amoniak zmiany pH z zaburzeniami zlokalizowanej w astrocytach odnogi szlaku glutaminian-glutamina, a zatem końcowego etapu anaplerozy [6].

Powyższe refleksje nie wyczerpują bogactwa pomysłów i inspiracji, jakimi Profesor obdarzał środowisko naukowe za życia, ani tym bardziej nie są w stanie ogarnąć piętna, jakie Jego osobowość wycisnęła na badaniach naukowych prowadzonych po Jego odejściu. Dalekosiężna trafność Jego idei odbiera sens okolicznościowemu zamykaniu ich w archiwach.

LITERATURA

- [1] ALBRECHT J. Effect of carbon monoxide hypoxia on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J Neurochem* 1973; **21**: 1563–1566.
- [2] ALBRECHT J, HILGIER W. Brain carbonic anhydrase activity in rats in experimental hepatogenic encephalopathy. *Neurosci Lett* 1984; **45**: 7–10.
- [3] ALBRECHT J, JONES EA. Hepatic encephalopathy: Molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 1999; **170**: 138–146.
- [4] BENNE R, BROWN-LUEDDI ML, HERSHEY JW. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 1978; **253**: 3070–3077.
- [5] BOYARSKY G, RANSOM B, SCHLUE WR, DAVIS MB, BORON WF. Intracellular pH regulation in single cultured astrocytes from rat forebrain. *Glia* 1993; **8**: 241–248.
- [6] BROOKES N. Functional integration of the transport of ammonium, glutamate and glutamine in astrocytes. *Neurochem Int* 2000; **37**: 121–129.
- [7] CHALIMONIUK M, STROSZNAJDER J. NMDA receptor-dependent nitric oxide and cGMP synthesis in brain hemispheres and cerebellum during reperfusion after transient forebrain ischemia in gerbils: effect of 7-Nitroindazole. *J Neurosci Res* 1998; **54**: 681–690.
- [8] COOPER MS. Intercellular signaling in neuronal-glia networks. *Biosystems* 1995: 3465–3485.

- [9] DOMAŃSKA-JANIK K, ZALEWSKA T. Effect of brain ischemia on protein kinase C. *J Neurochem* 1992; **58**: 1432–1439.
- [10] DOMAŃSKA-JANIK K, BONG P, BRONISZ-KOWALCZYK A, ZAJĄC H, ZABŁOCKA B. API transcriptional factor activation and its relation to apoptosis of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 1999; **57**: 840–846.
- [11] FAFF-MICHALAK L, ALBRECHT J. The two catalytic components of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: comparison of the response to *in vitro* treatment with ammonia hyperammonemia, and hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* 1993; **18**: 119–123.
- [12] KLATZO I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 1967; **26**: 1–14.
- [13] LAI JC, COOPER AJ. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem Res* 1991; **16**: 795–803.
- [14] ŁAZAREWICZ JW, PLUTA R, SALIŃSKA E, PUKA M. Beneficial effect of nimodipine on metabolic and functional disturbances in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. *Stroke* 1989; **20**: 70–77.
- [15] MATYJA E. Morphologic evidence of a primary response of glia to kainic acid administration into the rat neostriatum; studies *in vivo* and *in vitro*. *Exp Neurol* 1986; **92**: 609–623.
- [16] MOSSAKOWSKI MJ, RENKAWEK K, KRAŚNICKA Z, ŚMIAŁEK M, PRONASZKO A. Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta Neuropathol (Berl)* 1970; **16**: 1–16.
- [17] MOSSAKOWSKI MJ, LONG DM, MYERS R, KLATZO I. The early histochemical and ultrastructural changes in perinatal asphyxia. *J Neuropathol Exp Neurol* 1968; **27**: 126–137.
- [18] NORENBERG MD. Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; **16**: 245–253.
- [19] NORENBERG MD, MARTINEZ-HERNANDEZ A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 1979; **161**: 303–310.
- [20] RENKAWEK K, KRAŚNICKA Z, MAJDECKI T, MOSSAKOWSKI MJ. Glial changes *in vitro* induced by the inhibitor of succinic dehydrogenase. *Acta Neuropathol (Berl)* 1973; **26**: 107–114.
- [21] SHANK RP, BENNETT GS, FREYTAG SO, CAMPBELL GL. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res* 1985; **329**: 364–367.
- [22] SHULMAN RG, HYDER F, ROTHMAN DL. Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6417–6422.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Adres autora: 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5

E-mail: jalb@cmdik.pan.pl

ROLA BIAŁEK STAT5 W SCHORZENIACH UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

THE ROLE OF STAT5 PROTEINS IN HEMATOLOGIC DISEASES

Magdalena BAŚKIEWICZ-MASIUK, Bogusław MACHALIŃSKI

Zakład Patologii Ogólnej PAM w Szczecinie

Streszczenie: Białka STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) należą do grupy białek biorących udział w przekazywaniu informacji z powierzchni komórek do jądra oraz w aktywacji transkrypcji genów. Aktywowane są w odpowiedzi na szereg cytokin, czynników wzrostu i hormonów. Do chwili obecnej zidentyfikowano 6 rodzajów białek STAT: STAT1, 2, 3, 4, 5a/5b, 6. Dotychczas ustalono, iż pełnią one ważne funkcje regulacyjne w wielu procesach fizjopatologicznych, począwszy od odpowiedzi układu immunologicznego do regulacji cyklu komórkowego i transformacji nowotworowej komórek. Istnieją także doniesienia odnoszące się do zaburzeń w przekazywaniu sygnału drogą JAK-STAT m.in. w niektórych schorzeniach układu krwiotwórczego. W pracy omówiono mechanizm działania, budowę oraz sposoby inaktywacji białek STAT. Przedstawiono ponadto najnowsze informacje dotyczące roli białek STAT5 w funkcjonowaniu układu krwiotwórczego, immunologicznego oraz jego udział w procesie karcynogenezy.

Słowa kluczowe: STAT5, JAK, hematopoeza, schorzenia hematologiczne.

Summary: The STAT proteins (*signal transducers and activators of transcription*) belong to a group of proteins that take part in transducing an extracellular signal from the cell surface into the nucleus. They are activated by binding cytokines, growth factors and hormones to their receptor. Seven STAT proteins are identified up to now: STAT 1, 2, 3, 4, 5a/b and 6. They have proved to play an important role in many of the physiopathological processes related to the immune responses, cell growth, cell cycle regulation and cell transformation. Many studies show that alterations in the JAK-STAT pathway are associated with hematologic diseases. In the present study we discuss structure, functioning and means of inactivation of the STAT protein. Moreover we have presented the latest information about the role that STAT5 proteins plays in hematopoiesis, hematologic diseases and functions of immunologic system.

Key words: STAT5, JAK, hematopoiesis, hematologic diseases.

Wykaz stosowanych skrótów: AIF (ang. *Apoptosis-inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę, ALL (ang. *Acute lymphoblastic leukemia*) – ostra białaczka limfoblastyczna, AML (ang. *Acute myelogenous leukemia*) – ostra białaczka szpikowa, BFU-E (ang. *Burst Forming Unit of Erythrocytes*) – jednostka tworząca w hodowli kolonie erytrocytarne, CFU-GM (ang. *Colony Forming Unit of Granulocyte-Macrophages*) – jednostka tworząca kolonie granulocytowo-makrofagowe, **chromosom Ph** –

chromosom Philadelphia, **CIS** (ang. *Cytokine-induced SH2-containing protein*) – białko zawierające domenną SH2 aktywowane działaniem cytokin, **CML** (ang. *Chronic myelogenous leukemia*) – przewlekła białaczka szpikowa, **CNTF** (ang. *Ciliary neurotrophic factor*) – rzęskowy czynnik neurotropowy, **CSF-1R** (ang. *Colony stimulating factor-1 receptor*) – receptor dla czynnika stymulującego kolonie, **CT-1** (ang. *Cardiotrophin-1*) – kardiotropina, **EGF-R** (ang. *Epidermal growth factor-receptor*) – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu, **EPO** – erytropoetyna, **GAS** (ang. *INF- γ -activated sequence*) – sekwencja aktywowana przez interferon- γ , **GH** (ang. *Growth hormone*) – hormon wzrostu, **G-CSF** (ang. *Granulocyte-colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytowe, **GM-CSF** (ang. *Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytowo-makrofagowe, **HL60** – ustalona linia komórkowa białaczki promielocytowej (M3 wg FAB), **HTLV-1** (ang. *Human T cell lymphotropic virus 1*) – ludzki wirus limfocytotropowy typu 1, **IL-2** – interleukina-2, **IL-3** – interleukina-3, **IL-5** – interleukina-5, **IL-7** – interleukina-7, **IL-9** – interleukina-9, **IL-10** – interleukina-10, **IL-13** – interleukina-13, **IL-15** – interleukina-15, **IFN α** – interferon α , **IFN β** – interferon β , **IFN γ** – interferon γ , **ISRE** (ang. *IFN α -stimulated response element*) – element odpowiedzi stymulowany przez IFN α , **JAB** (ang. *Jak-binding protein*) – białko wiążące się z białkiem JAK, **JAK** (ang. *Janus-activated kinase*) – kinaza Janusowa, **K562** – ustalona linia komórkowa przewlekłej białaczki szpikowej, **KL** (ang. *Kit Ligand*) – ligand receptora c-Kit, **LIF** (ang. *Leukemia inhibitory factor*) – czynnik hamujący białaczkę, **MAP** (ang. *Mitogen-activated protein*) – białko aktywowane mitogenami, **OSM** (ang. *Oncostatin M*) – onkostatyna M, **PDGF-R** (ang. *Platelet-derived growth factor-receptor*) – receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu, **pim1** – gen kodujący jedną z kinaz serynowo-treoninowych wyizolowany pierwotnie z drożdży *Pichia pastoris*, **PRL** – prolaktyna, **PIAS** (ang. *Protein inhibitors of activated STATs*) – białka hamujące aktywne STAT, **SH2** (ang. *SRC homology 2 domain*) – domena homologiczna do domeny aktywnej białek Src, **SCF** (ang. *Stem cell factor*) – czynnik wzrostowy komórek pnia, **SOCS** (ang. *Suppressor-of-cytokine-signaling protein*) – białko hamujące przekazywanie sygnału przez cytokiny, **SSIs** (ang. *STAT-induced STAT inhibitors*) – inhibitory STAT indukowane przez STAT, **STAT** (ang. *signal transducers and activators of transcription*) – przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji, **TPO** – trombopoetyna.

WSTĘP

Wymiana informacji oraz swoista komunikacja między poszczególnymi komórkami organizmu, przekazywana przez hormony, czynniki wzrostu lub cytokiny, wymaga efektywnego połączenia się danego ligandu z odpowiednim receptorem komórkowym. Wyzwała to z kolei sekwencję następujących po sobie zdarzeń, których końcowym efektem może być wpływ na ekspresję danego genu w komórce docelowej. W pierwszym etapie dochodzi do aktywacji białka receptorowego bądź jego domeny cytoplazmatycznej, co zazwyczaj wiąże się z jego fosforylacją. Część białek receptorowych ma wewnętrzną aktywność swoistych kinaz, inne natomiast wymagają kooperacji dodatkowych białek pośredniczących. Po aktywacji białka receptorowego następuje przekazanie sygnału do jądra. Zazwyczaj odbywa się to drogą fosforylacji białek cytoplazmatycznych, stanowiących przekaźnik drugiego rzędu. Do białek partycypanyjących w przekazywaniu sygnałów należą, odkryte i opisane w 1992 r., białka STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*), które dodatkowo biorą bezpośredni udział w modulowaniu ekspresji genów jako czynniki transkrypcyjne. Po raz pierwszy zostały one opisane jako białka ulegające aktywacji i wiążące się z DNA po pobudzeniu komórki przez IFN [32,35]. IFN α/β oraz IFN γ łączą się z różnymi

receptorami na powierzchni komórek (odpowiednio receptor typu I i II), co w konsekwencji powoduje ekspresję odmiennych genów. Analizując przekazywanie sygnału wewnątrz komórek podlegających działaniu IFN odkryto 2 rodzaje białek: p91 później nazwane STAT1 i p113 nazwane STAT2. W odpowiedzi na działanie IFN α/β powstawały heterodimery składające się z białka STAT1 i STAT2, które wraz z dodatkowym białkiem p48 tworzyły kompleks białkowy wiążący się z DNA w miejscu nazwanym ISRE (ang. *IFN α -stimulated response element*), natomiast w przypadku IFN γ dimery składały się wyłącznie z białka STAT1 i wiązały się z miejscem nazwanym GAS (ang. *IFN- γ -activated sequence*) [23].

Do chwili obecnej u ssaków zidentyfikowano 6 rodzajów białek STAT: STAT1, 2, 3, 4, 5a/5b, 6. Odmienny *splicing* – proces dojrzewania mRNA – może prowadzić do powstawania izoform białek STAT [19,91]. Białka STAT zostały dobrze scharakteryzowane zarówno w organizmach ssaków, jak i u niższych ewolucyjnie organizmów [32]. Do tej pory wiadomo, że biorą one udział w odpowiedzi komórek na szereg zewnątrzkomórkowych polipeptydów sygnałowych. Poza wymienionymi już interferonami, należącymi do typu II cytokin, również cytokiny typu I prowadzą do pobudzenia białek cytoplazmatycznych STAT. Są to związki krótkołańcuchowe, takie jak: rodzina IL-2, które mają w budowie receptora wspólny łańcuch γ i do których należą: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, ponadto IL-13 oraz grupa peptydów o wspólnym łańcuchu β w budowie receptora: IL-3, GM-CSF, IL-5. Cytokiny długołańcuchowe: IL-6, IL-11, OSM (ang. *oncostatin M*), CNTF (ang. *ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (ang. *cardiotrophin-1*), LIF (ang. *leukemia inhibitory factor*) oraz GH, PRL, EPO, TPO również prowadzą do pobudzenia białek STAT.

Z białkami STAT związana jest rodzina kinaz JAK (ang. *Janus-activated kinase*), odpowiedzialna za ich aktywację. Tworzą ją: JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2 [9]. Swą nazwę kinazy JAK przyjęły od rzymskiego boga drzwi i bram – Janusa. Podobnie jak bóstwo o dwóch twarzach, białka mają 2 domeny: jedną odpowiedzialną za ich aktywność kinazową, drugą, przypominającą budową domenę aktywną, o nieznaną jeszcze funkcję [35,45].

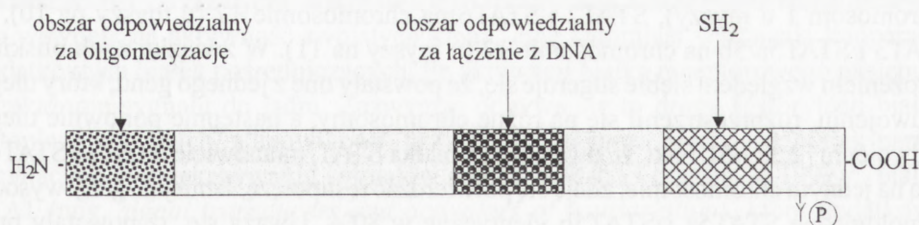
Większość czynników transkrypcyjnych STAT zbudowana jest z 750–800 aminokwasów. Jedynie białka STAT2 i 6 mają większą masę, bo zbudowane są z około 850 aminokwasów. Geny kodujące białka STAT zlokalizowane są na 3 chromosomach, w przypadku STAT1 i STAT4 na chromosomie 2 u człowieka (chromosom 1 u myszy), STAT2 i STAT6 na chromosomie 17 (u myszy na 10), a STAT3 i STAT5a/5b na chromosomie 12 (u myszy na 11). W związku z ich bliskim położeniem względem siebie sugeruje się, że powstały one z jednego genu, który uległ podwojeniu, rozprzestrzenił się na różne chromosomy, a następnie ponownie uległ podwojeniu [2,32,45]. Fakt, że dwa dłuższe białka STAT, mianowicie STAT2 i STAT6, leżą na jednym chromosomie, zdaje się potwierdzać tę hipotezę. Istnieją 2 geny wysoce homologiczne STAT5a i STAT5b identyczne w 80%. Uważa się, iż powstały one stosunkowo niedawno przez kolejne podwojenie. Geny te są jak dotąd jedynymi stwierdzonymi genami STAT występującymi w 2 postaciach.

BUDOWA BIAŁEK STAT

Białka STAT mają kilka wspólnych strukturalnych i funkcjonalnych obszarów (domen). Jednym z ważniejszych jest konserwatywny rejon SH2 (ang. *SRC homology 2 domain*), odpowiedzialny za łączenie się białek z ufosforylowanymi tyrozynami, czyli pobudzonymi receptorami i kinazami JAK. Jest on również niezbędny w dimeryzacji białek STAT [5,32]. Inną ważną domeną jest motyw SH3 o niewyjaśnionej jeszcze funkcji. W pobliżu końca karboksylowego białka, w okolicy 700 aminokwasu zlokalizowana jest tyrozyna, której fosforylacja jest niezbędna do aktywacji białka STAT. Aktywacja umożliwia dimeryzację białek przez łączenie się ufosforylowanych tyrozyn z domeną SH2 drugiego białka STAT [32]. Kolejną istotną domenę w budowie białek STAT stanowi miejsce wiązania DNA, leżące między pozycją 400 a 500 w sekwencji aminokwasowej białka.

Koniec karboksylowy łańcucha odpowiada za aktywność transkrypcyjną STAT. Białka pozbawione kilkunastu aminokwasów z końca COOH, pomimo możliwości tworzenia dimerów i przyłączania się do DNA, nie są zdolne do aktywacji transkrypcji [32]. Ten fragment cząsteczki białka jest wysoce zmienny i pomimo faktu, iż białka STAT wiążą się z podobnymi w budowie, semipalindromowymi sekwencjami DNA – TTCCXXXGGAA, odpowiadają za aktywację transkrypcji różnych genów. Opisano warianty β niektórych białek (STAT1 β , STAT3 β , STAT5 β), które są pozbawione kilku aminokwasów z końca COOH, w związku z czym nie są zdolne do aktywacji transkrypcji. Postacie β hamują aktywność białek STAT [18]. Wprowadzenie dominującej, nieaktywnej pochodnej STAT5 (STAT5 β) do komórek nowotworowych, w których stwierdzono nadmierną aktywację białka STAT5, powoduje zahamowanie wzrostu oraz wzrost odsetka komórek wchodzących w proces apoptozy [78]. Koniec karboksylowy jest również odpowiedzialny za degradację białek STAT w proteasomach [90].

Na funkcję białek i ich czynność transkrypcyjną może mieć wpływ również fosforylacja seryny bądź treoniny [2,19,32]. Wiadomo, że fosforylacja seryny STAT1 i STAT3 jest istotna dla aktywacji transkrypcji [44]. Nie jest do końca jasne, jakie kinazy są za to odpowiedzialne, jednakże na podstawie budowy obszaru otaczającego



RYCINA 1. Budowa białek STAT

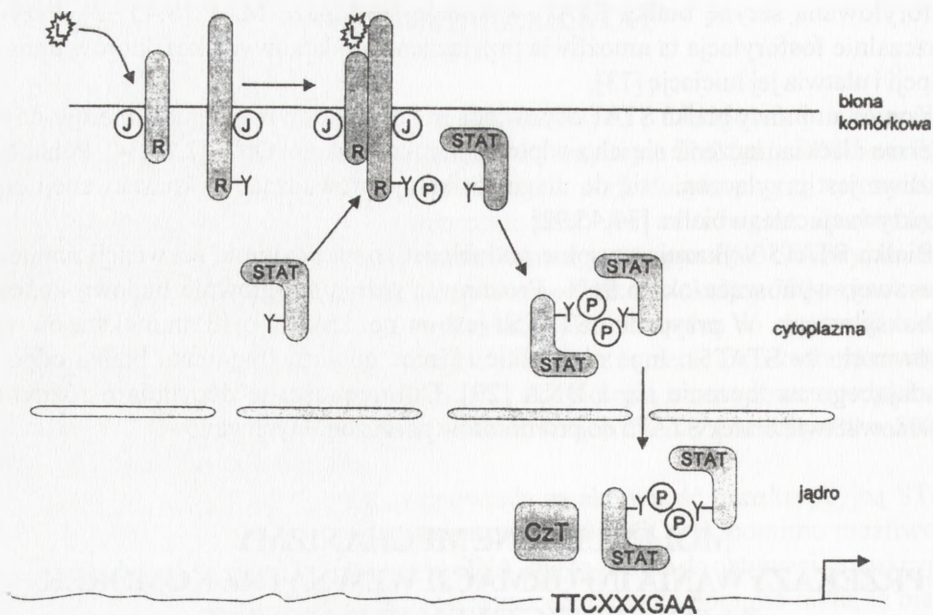
fosforylowaną serynę białka STAT, wskazuje się kinazę MAP [8,45,92]. Przypuszczalnie fosforylacja ta umożliwi przyłączenie dodatkowych kofaktorów transkrypcji i ułatwia jej inicjację [73].

Koniec aminowy białka STAT odpowiada za zdolność do tworzenia dimerów, co z kolei ma ułatwiać łączenie się ich z odpowiednimi odcinkami DNA [2,19,34]. Ponadto możliwe jest przyłączanie się do niego fosfatazy, prowadzące w konsekwencji do dezaktywacji całego białka [34,45,92].

Białka STAT5 wykazują wysokie podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowej, wynoszące około 96%. Proteiny te różnią się głównie budową końca karboksylowego. W przypadku STAT5b jest on np. krótszy o 13 aminokwasów w porównaniu ze STAT5a. Inne niewielkie różnice dotyczą fragmentu białka odpowiadającego za łączenie się z DNA [29]. Odmienności te decydują o różnym powinowactwie białek STAT5 do promotorów poszczególnych genów.

MOLEKULARNE MECHANIZMY PRZEKAZYWANIA INFORMACJI WEWNĄTRZ KOMÓREK ZA POŚREDNICTWEM BIAŁEK STAT

Białka STAT znajdują się w cytoplazmie w formie nieaktywnej, a ich aktywacja jest konsekwencją połączenia ligandu z receptorem powierzchniowym na powierzchni komórki. Do receptorów, których pobudzenie prowadzi do fosforylacji białek STAT, należy przede wszystkim nadrodzina receptorów cytokinowych [2,5,32,44], niektóre receptory o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej (EGF-R, PDGF-R, CSF-1R) [2,19,32] oraz pewne receptory serpentynowe związane z białkami G (receptor dla angiotenzyny II) [2,32]. Po przyłączeniu cytokiny, czynnika wzrostu czy też innego peptydu sygnałowego do odpowiadającego mu receptora następuje aktywacja kompleksu ligand-receptor oraz dimeryzacja poszczególnych części receptora w jedną całość. W zależności od rodzaju receptora wyzwała to autofosforylację, jak np. w przypadku receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej, lub fosforylację kinaz cytoplazmatycznych JAK. Kinazy JAK, związane niekowalencyjnie z cytoplazmatyczną częścią receptora, powodują jego aktywację. W przypadku receptorów tworzących homodimery, po związaniu z odpowiednim ligandem (np. GH, EPO) dochodzi jednocześnie do powstawania homodimerów kinaz JAK. Analogicznie, aktywacja receptorów tworzących heterodimery (np. receptory dla interleukin) powoduje powstanie heterodimerów białek JAK [33,45]. Chociaż powszechnie uważa się, że fosforylacja receptora jest niezbędna do przekazywania sygnału, wykazano, używając zmodyfikowanego receptora z usuniętymi miejscami fosforylacji, że przy bardzo wysokim stężeniu cytokiny możliwa jest aktywacja drogi przekazywania sygnału poprzez bezpośrednią aktywację białek STAT przez kinazy JAK [28].



RYCINA 2. Mechanizm działania białek STAT: L – ligand, R – podjednostka receptora. J – kinaza JAK, Y – tyrozyna, CzT – dodatkowy czynnik transkrypcyjny

Po aktywacji białka receptorowego powstaje w jego obrębie miejsce dla związania białka STAT, które przyłącza się następnie do receptora za pomocą domeny SH2 [5,19]. Za aktywację białek STAT po połączeniu ich z receptorem bezpośrednio odpowiedzialna jest grupa kinaz JAK. Wyjątek stanowią receptory o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej np. EGFR, mające zdolność bezpośredniej fosforylacji STAT. Często mówi się o drodze przekazywania sygnałów JAK-STAT, choć białka JAK aktywują również inne wewnątrzkomórkowe drogi przekazywania sygnałów, takie jak: Ras/MAPK czy kinaza Pyk2, Shc, Grb2 [45]. Połączenie ligandu z receptorem może aktywować jednocześnie kilka dróg sygnałowych, co więcej drogi te mogą między sobą oddziaływać [31,55]. W większości przypadków białka STAT są fosforylowane po związaniu w odpowiednim miejscu z receptorem. Istnieją jednak wyjątki od tej reguły. Stwierdzono możliwość aktywacji białek STAT po przyłączeniu ich bezpośrednio do kinaz JAK lub do wcześniej połączonej z receptorem innej cząsteczki STAT [19,44,91].

Po ufosforylowaniu czynników transkrypcyjnych STAT przez kinazy JAK następuje dimeryzacja białek STAT. Dimery powstają pomiędzy regionem SH2 jednego białka a ufosforylowaną tyrozyną drugiego [5]. Taki układ, w związku z istnieniem dwóch miejsc wiązania, jest stabilny. Tylko dimery STAT mają zdolność łączenia się z DNA [19,45]. Nie jest jasne, czy dimeryzacja zachodzi przed czy po odłączeniu się od

receptora. Białka STAT mogą tworzyć homodimery i heterodimery. Najczęściej występujące heterodimery to STAT1:STAT2, STAT1:STAT3, STAT5A:STAT5B. Jedynym białkiem, które nie tworzy homodimerów, jest STAT2 [44]. Ponieważ w wielu genach stwierdzono występowanie blisko siebie regionów odpowiedzialnych za przyłączanie czynników transkrypcyjnych STAT, prawdopodobne jest tworzenie przez białka STAT tetramerów przy udziale ich końca aminowego [44]. Taka sytuacja umożliwia czynnikom transkrypcyjnym wytworzenie bardziej stabilnych wiązań z DNA oraz połączenie się z większą liczbą genów.

Dimery STAT są transportowane do jądra, jednakże mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko pozostaje nieznany. W jądrze komórkowym białka te, jako czynniki transkrypcyjne, przyłączają się do promotorów odpowiednich genów i wpływają na ich ekspresję. Większość białek STAT wiąże się z sekwencjami semipalindromowymi, wykazującymi homologię do tzw. sekwencji GAS (ang. *IFN- γ -activated sequence*), pierwotnie opisaną jako miejsce wiązania przez czynnik transkrypcyjny STAT1 po pobudzeniu komórek przez IFN γ . Do sekwencji innej niż semipalindromowa wykazują powinowactwo jedynie kompleksy powstałe po przyłączeniu IFN α/β do odpowiedniego receptora w związku z aktywacją dodatkowego białka p48. Pewne zainteresowanie może wzbudzić fakt, iż białka STAT łączą się również z innymi czynnikami wpływającymi na transkrypcję (np. z Sp1, c-Jun, kompleksem p300/CBP czy receptorem glikokortykosteroidowym). Tworząc kompleksy białkowe czynniki transkrypcyjne mogą działać synergistycznie, przez co zwiększają szansę przyłączenia się polimerazy RNA II do DNA i inicjację transkrypcji [1,19,44,45,49,87,91]. W ostatnich latach opisano także czynniki transkrypcyjne hamujące czynność STAT [60].

Niektóre z białek STAT mają wąski profil aktywacji, np. STAT2 ulega fosforylacji tylko po przyłączeniu IFN α do odpowiedniego receptora na powierzchni komórki. Inne, jak STAT5 są aktywowane przez wiele polipeptydów sygnałowych. Może nasunąć się zatem pytanie, w jaki sposób uczestniczą one w specyficznej odpowiedzi biologicznej. Specyficzność działania STAT wynika częściowo z obecności i rozmieszczenia różnych białek receptorowych na powierzchni różnych komórek w określonym czasie ich rozwoju [2,19]. Znaczenie odgrywa również budowa samego receptora pod względem obecności miejsc akceptorowych dla białek STAT [2,19]. Stwierdzono, iż jedno białko receptorowe ma kilka miejsc zdolnych do połączenia się z białkami STAT. W wyniku tego równocześnie może podlegać aktywacji 2 lub więcej rodzajów tych białek, w zależności od ich zdolności wiązania się z danym receptorem [5,11,31]. Uważa się, że kinazy JAK nie odpowiadają za swoistość przyłączenia białka STAT do receptora [45]. Na specyficzność działania białek STAT wpływa ponadto obecność hetero- i homodimerów, tetramerów, i izoform białek STAT, powstających w wyniku różnego *splicingu* mRNA, jak również łączenie się białek STAT z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Warunkuje to zróżnicowane powinowactwo do DNA, a więc odmienną zdolność do pobudzania transkrypcji [91]. Istotna jest również budowa odcinka DNA, do którego przyłącza się określone białko STAT.

MECHANIZMY INAKTYWACJI BIAŁEK STAT

Aktywacja białek STAT w komórce najczęściej jest przejściowa. Kompleksy STAT-DNA można zidentyfikować już po kilku minutach od zadziałania cytokiny na komórkę [45]. Białka te przestają być aktywne po czasie trującym od kilkunastu minut do godziny. Na straży zachowania odpowiedniej proporcji białek ufosforylowanych i nieufosforylowanych stoi szereg mechanizmów odpowiedzialnych za ich dezaktywację. Należy do nich defosforylacja tyrozyny zachodząca przy udziale fosfatazy tyrozynowej [92,95], czy degradacja białek STAT w proteasomach po przyłączeniu do nich ubikwityny – małowzrostkowego białka odpowiedzialnego za „wyznaczenie” białek mających ulec degradacji [89,90]. Kolejnym mechanizmem ograniczania aktywacji białek STAT jest endocytoza kompleksu receptor/JAK. Opisano również białka inhibitorowe, do których należy rodzina CIS/SOCS/JAB/SSI [9,89]. Jest to grupa 8 niewielkich protein, związanych z regulacją przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Obserwuje się wzrost ekspresji tych białek po aktywacji receptora. Poprzez wiązanie się z częścią cytoplazmatyczną receptora lub z białkami JAK blokują one aktywację białek STAT. Kolejna grupa czynników – PIAS (*protein inhibitors of activated STATs*) blokuje czynność STAT przez wiązanie się z postaciami ufosforylowanymi tych białek. W chwili obecnej znane są białka PIAS1 i PIAS3 łączące się odpowiednio ze STAT1 i STAT3, ale sugeruje się obecność osobnych białek PIAS dla każdego podtypu STAT [2,19,44,91]. Również budowa samego białka może wpływać na szybkość jego degradacji. STAT pozbawione kilkudziesięciu aminokwasów z końca karboksylowego pozostają około 3 razy dłużej aktywne niż ich postacie „dzikie” [35].

PATOFIZJOLOGICZNA ROLA BIAŁEK STAT5

W związku z powszechnym występowaniem cząsteczek sygnałowych, które aktywują czynniki transkrypcyjne STAT, ustalono, iż białka te pełnią ważne funkcje regulacyjne w wielu procesach fizjopatologicznych: od odpowiedzi układu immunologicznego i regulacji cyklu komórkowego do wpływu na proces zaprogramowanej śmierci komórki – apoptozy czy transformacji nowotworowej komórek. Dokładną funkcję białek STAT poznano dzięki szczegółowym badaniom przeprowadzonym w warunkach *in vitro*, wykorzystując ustalone linie komórkowe oraz *in vivo*, poprzez tworzenie genetycznie zmodyfikowanych myszy, u których wyłączono geny kodujące poszczególne białka STAT [2].

Białko STAT5 po raz pierwszy odkryto w gruczole sutkowym u owcy. Nazwano je wówczas MGF (ang. *mammary gland factor*) i wykazano, iż jest ono czynnikiem transkrypcyjnym zależnym od prolaktyny, wpływającym na ekspresję genu β -kazeiny [56]. W toku dalszych badań ustalono, że białko STAT5 aktywowane jest w odpowiedzi na wiele cytokin: GH, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, G-CSF, TPO, EPO, EGF, KL, Flt3 ligand [5,10,15,41,49,55,57,97]. Kolejnym krokiem była

identyfikacja dwóch białek STAT5, nazwanych STAT5a i STAT5b, wykazujących wysoką homologię zarówno na poziomie cDNA, jak i samego białka [29]. Ekspresja obu genów w komórkach jest podobna, najwyższa w grasicy, śledzionie i limfocytach T. Jako czynniki transkrypcyjne, białka STAT5 rozpoznają tzw. sekwencję palindromową TTCXXXGAA promotorów różnych genów. Wykazano ich wpływ na transkrypcję genu β -kazeiny, IL-2R α , CIS, c-myc, bcl-2, bcl-x, pim1, p21, cyklinyD1 i cyklinyD2 [48,49,63,91].

Różne postacie białka STAT5 pełnią częściowo odmienną funkcję w komórce. Zablockowanie STAT5a u myszy wpływa niekorzystnie na rozwój gruczołów sutkowych w czasie ciąży i produkcję mleka po porodzie [56]. U myszy STAT5a^{-/-} obecne białko STAT5b nie jest w stanie zapewnić prawidłowego rozwoju gruczołów sutkowych. Natomiast samice myszy STAT5b^{-/-} mają zachowaną laktację, co sugeruje, iż białko STAT5b nie bierze udziału w odpowiedzi komórek na PRL. STAT5b odpowiada za powstawanie dymorfizmu płciowego zależnego od hormonu wzrostu. U osobników męskich myszy zablockowanie białka STAT5b prowadzi do zmniejszenia ekspresji niektórych genów wątrobowych indukowanych hormonem wzrostu do poziomu ekspresji tych genów obserwowanego u samic. Co więcej myszy te są mniejsze od zwierząt „dzikich” i fenotypowo przypominają zespół Larona występujący u ludzi (niedobór wzrostu z opornością na działanie GH, wynikającą z nieprawidłowego receptora dla hormonu wzrostu) [82]. Pulsacyjne wydzielanie GH przez przysadkę, co ma miejsce u osobników męskich, pobudza białko STAT5, natomiast wydzielanie ciągłe u osobników żeńskich nie powoduje wzrostu aktywnej postaci białka STAT5. U myszy STAT5ab^{-/-} – stwierdzono natomiast defekt produkcji ciała żółtego w jajnikach, objawiający się nieplodnością [19].

FUNKCJA BIAŁEK STAT5 W REGULACJI KRWIOTWORZENIA

Szeroki wpływ cytokin i czynników wzrostu, działających poprzez białka STAT na krwiotworzenie, określa ich rolę w rozwoju i funkcjonowaniu całego układu hematopoetycznego. W niektórych jednostkach chorobowych układu krwiotwórczego, takich jak: wrodzona niedokrwistość aplastyczna typu Fanconiego czy ciężka wrodzona neutropenia, opisano zaburzenia prawidłowej funkcji białek STAT [21,91]. W łagodnej erytrocytozie, która charakteryzuje się ograniczonym rozrostem układu czerwono-krwinkowego i wzmoczoną odpowiedzią komórek szpiku na EPO, stwierdzono utrzymującą się aktywację STAT5. Wynika to z nieprawidłowej budowy receptora dla EPO oraz nadmiernej aktywacji Jak2, które to białko stymuluje STAT5 [91].

U płodów myszy STAT5ab^{-/-} stwierdza się niedokrwistość, w związku z upośledzoną odpowiedzią komórek szpiku na EPO, główny regulator powstawania erytrocytów. Ilość komórek progenitorowych układu czerwono-krwinkowego u tych zwierząt jest zmniejszona, na skutek zwiększonego odsetka komórek wchodzących na drogę apoptozy. W tym przypadku wynika to ze zmniejszenia ekspresji genu kodującego jedno z białek

antyapoptotycznych – Bcl-x_L [16,84]. Białko to, znajdując się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, jest odpowiedzialne za hamowanie uwalniania cytochromu c oraz AIF (ang. *apoptosis-inducing factor*) z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Jego brak doprowadza do aktywacji kaskady kaspaz oraz zmian morfologicznych charakterystycznych dla procesu zaprogramowanej śmierci komórki [36,39,71]. STAT5 odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu prawidłowej ilości erytrocytów u płodów mysich w trakcie ich rozwoju wewnątrzmacicznego, jak również u nowonarodzonych osobników [16,84,85]. W przypadku dorosłych myszy jego rola w tym względzie pozostaje wciąż do końca niewyjaśniona. Według niektórych autorów dorosłe myszy STAT5ab^{-/-} mają prawidłową liczbę komórek krwi [40,86]. *In vitro* obserwowano natomiast zmniejszoną klonogenność komórek hematopoetycznych, w których zablokowano STAT5, po stymulacji ich IL-3 i GM-CSF w porównaniu z typem „dzikim”. Większy jest również odsetek komórek ulegających procesowi apoptozy w związku z brakiem wpływu białka STAT5 na ekspresję genu Bcl-x_L [40]. Co więcej według niektórych autorów, dorosłe osobniki, pomimo utrzymywania prawidłowej ilości erytrocytów w normalnych warunkach, nie potrafią wytwarzać odpowiedniej ilości krwinek czerwonych w stanie stresu, jakim jest dla układu krwiotwórczego niedotlenienie. Dodatkowo u części dorosłych myszy stwierdzono przewlekłą anemię. Sugeruje się, iż funkcja STAT5 w przypadku komórek układu czerwono krwinkowego polega głównie na ochronie komórek przed procesem apoptozy w czasie ich różnicowania [40,85]. Rola białek STAT5 jest szczególnie istotna w przypadku zmniejszonego stężenia cytokin lub wtedy, gdy potrzebna jest szybka mobilizacja komórek ze szpiku kostnego [40].

Ostatnio sugerowano, że białka STAT5 są niezbędne w rozwoju wszystkich szeregów układu krwiotwórczego, głównie jednak erytrocytarnego, z uwagi na ich wpływ na komórki progenitorowe szpiku kostnego [83]. Wykonano wiele doświadczeń w celu przybliżenia roli STAT5 w komórkach macierzystych krwiotworzenia, polegających m.in. na przeszczepianiu subletalnie napromieniowanym myszom komórek pochodzących od myszy STAT5ab^{-/-}. Zdolność do długotrwałego przeżycia przeszczepu była w tych przypadkach istotnie niższa [13,83].

Zwierzęta z zablokowanymi białkami STAT5a i STAT5b wykazują upośledzoną odpowiedź komórek na IL-2, IL-3, GM-CSF [49,91]. Klonogenność komórek szpiku kostnego, pochodzących od tych myszy, jest mniejsza po stymulacji GM-CSF w stosunku do komórek uzyskanych od myszy „dzikich”. Badania *in vitro* na liniach komórkowych potwierdzają tę zależność. Jednak wpływ białek STAT5 na odpowiedź komórek wobec wymienionych cytokin jest większy w badaniach *in vitro* niż *in vivo* na modelu mysim. Przepuszczalnie obecność innych dróg sygnałowych może maskować konsekwencje niedoboru tych białek w przypadku żywych organizmów [69,91].

Rzeczywista funkcja białka STAT5 w procesie hematopoezy nie jest jednak nadal ostatecznie wyjaśniona.

Zespół nasz prowadzi aktywne prace nad rolą białek STAT5 w ludzkiej hematopoezie. Wykorzystując komórki uzyskane ze szpiku kostnego i krwi pępowinowej w badaniach własnych posługujemy się m.in. strategią oligomerów antysensowych (ODNs). Są to

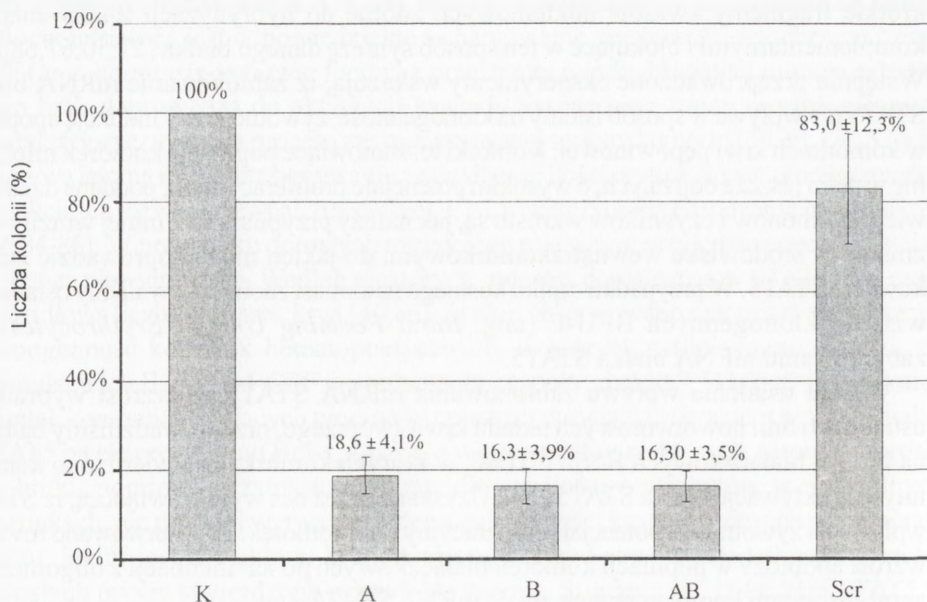
krótkie fragmenty kwasów nukleinowych zdolne do hybrydyzacji z sekwencjami komplementarnymi i blokujące w ten sposób syntezę danego białka [27,50,67,68,81]. Wstępnie przeprowadzone eksperymenty wskazują, iż zablokowanie mRNA białka STAT5 nie wpływa w sposób istotny na klonogenność, żywotność czy indukcję apoptozy w komórkach krwi pępowinowej. Komórki te, stanowiące populację komórek młodych nie w pełni jeszcze dojrzałych, o wysokim potencjale proliferacyjnym, poddane działaniu wielu hormonów i czynników wzrostu są, jak należy przypuszczać, mniej wrażliwe na zmiany w środowisku wewnątrzkomórkowym, do jakich może doprowadzić zablokowanie STAT5. W przypadku szpiku kostnego natomiast zaobserwowaliśmy osłabienie wzrostu klonogennych BFU-E (ang. *Burst Forming Unit of Erythrocytes*) po zablokowaniu mRNA białka STAT5.

W celu ustalenia wpływu zablokowania mRNA STAT5 na wzrost wybranych ustalonych linii nowotworowych układu krwiotwórczego, przeprowadziliśmy badania na liniach białaczkowych K562 i HL60, w których komórkach stwierdzono konstytutywną aktywację białka STAT5 [20]. Uzyskane przez nas wyniki świadczą, iż STAT5 wpływa na żywotność i potencjał proliferacyjny tych komórek. Zaobserwowano również wzrost apoptozy w populacji komórek białaczkowych po ich inkubacji z oligomerami antysensowymi komplementarnymi do mRNA STAT5.

ROLA BIAŁEK STAT5 W REGULACJI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

STAT5 znacząco wpływa na rozwój układu immunologicznego. Ilość splenocytów myszy STAT5a^{-/-} jest istotnie mniejsza niż ich ilość u myszy „dzikich” z prawidłową ekspresją tego białka. Limfocyty T u myszy STAT5a^{-/-} wykazują upośledzoną proliferację, co jak wykazano, można skompensować zastosowaniem wysokich dawek IL-2. Wynika to ze zmniejszenia ekspresji IL-2R α na tych komórkach, czyli nieobecności receptora dla IL-2 o wysokim powinowactwie [44]. Znacznie poważniejsze zmiany obserwowano w przypadku braku STAT5b. Zarówno ilość splenocytów, jak i tymocytów u zwierząt STAT5b^{-/-} jest zmniejszona. Splenocyty wykazują upośledzoną odpowiedź na IL-2 nawet przy jej wysokiej koncentracji. Stwierdza się defekt aktywności cytotoxicznej, podstawowej, jak i stymulowanej IL-2 i IL-15, komórek NK. Wykazano zmniejszoną ekspresję perforyny – białka uczestniczącego w eliminacji wybranych komórek przez komórki NK. Zablokowanie białka STAT5a nasila te zmiany, co skutkuje całkowitym brakiem populacji komórek NK u myszy STAT5ab^{-/-} [44,58].

Sugeruje się udział białek STAT5a i b w reakcji alergicznej. Oba białka odpowiadają za napływ eozynofików i limfocytów T CD4⁺ do dróg oddechowych po zadziałaniu alergenu. U myszy STAT5ab^{-/-} upośledzona infiltracja eozynofili wynika ze zmniejszonej produkcji IL-5 przez limfocyty T, interleukiny odpowiedzialnej za chemotaksję, oraz z upośledzonej eozynofilopoezy zależnej od IL-5. Co ciekawe, myszy

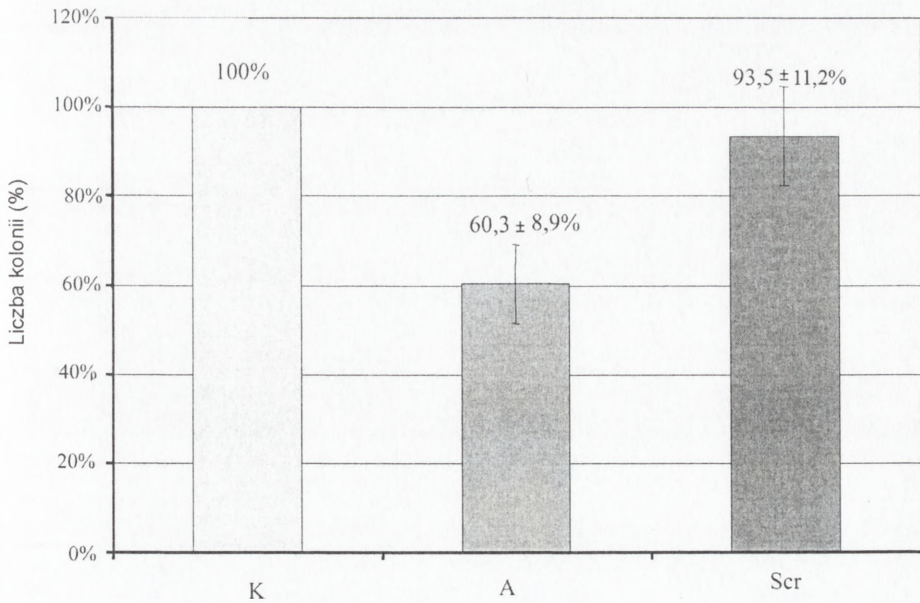


RYCINA 3. Wzrost klonogennych BFU-E szpiku kostnego człowieka po 24 h inkubacji z oligomerami antysensowymi (dawka w godzinie 0: 100 µg/ml; po 18 godz.: 50 µg/ml): K – grupa kontrolna (komórki nieinkubowane z oligomerami antysensowymi), A – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji antysensu dla STAT5A, B – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji antysensu dla STAT5B, AB – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji antysensu dla STAT5A i STAT5B, Scr – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji nieblokującej (ang. *scrambled*); wyniki wyrażono w wartościach względnych przy przyjęciu wartości dla kontroli za 100%

STAT5a^{-/-} wykazują zmniejszony poziom produkcji IgE, jak i IgG1 w odpowiedzi na alergen, czego nie obserwowano u myszy STAT5b^{-/-}. Może to wynikać ze zmniejszonej produkcji IL-4 przez komórki układu immunologicznego i stąd sugeruje się, że białko STAT5a może być niezbędne do rozwoju limfocytów Th2 w drodze zależnej od IL-4 [38]. Dla bliższego poznania funkcji białek STAT5 w rozwoju procesów zapalnych u zwierząt doświadczalnych wywołano zapalenie otrzewnej, po czym badano skład nacieku zapalnego. Stwierdzono istotny regulacyjny wpływ STAT5a i STAT5b na ilość makrofagów i granulocytów w opisywanym nacieku [38].

BIĄŁKA STAT5 W HEMATOONKOLOGII

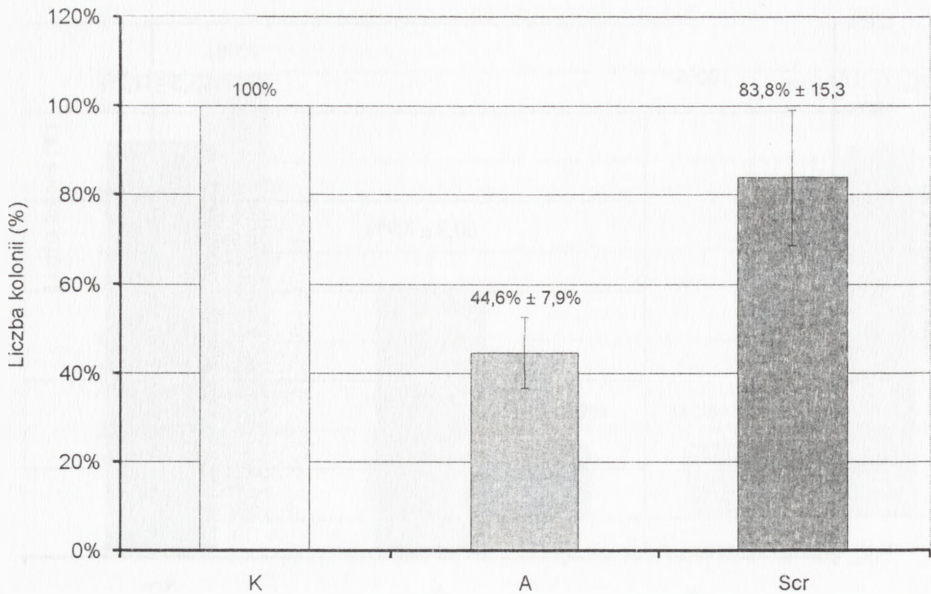
W związku z wpływem czynników transkrypcyjnych STAT na procesy proliferacji, różnicowania oraz na apoptozę, poprzez regulację ekspresji odpowiednich genów, rozpatruje się ewentualny udział tych białek w transformacji nowotworowej [8,18,69]. Nieprawidłową aktywację białek STAT zaobserwowano w wielu nowotworach m.in.



RYCINA 4. Wzrost klonogeny komórek ustalonej linii białaczkowej HL60 po 24 h inkubacji z oligomerami antysensowymi (dawka w godzinie 0: 100 $\mu\text{g/ml}$; po 18 godz.: 50 $\mu\text{g/ml}$): K – grupa kontrolna (komórki nieinkubowane z oligomerami antysensowymi), A – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji antysensu dla STAT5A, Scr – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji nieblokującej (ang. *scrambled*); wyniki wyrażono w wartościach względnych przy przyjęciu wartości dla kontroli za 100%

w raku sutka, prostaty, jajnika, nerki, płuca, trzustki, czerniaku złośliwym, nowotworach głowy i szyi, a także w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego, takich jak: ostre i przewlekłe białaczki oraz chłoniaki [6,9,24,25,57,70,88]. Do chwili obecnej zgromadzono wiele dowodów na udział białek STAT w patogenezie nowotworzenia. Badania przeprowadzone na ustalonych liniach komórkowych potwierdziły, iż obecność konstytutywnie aktywnych protein STAT jest wystarczająca do transformacji nowotworowej. Co więcej u zwierząt, którym przeszczepiono transformowane komórki, rozwijają się guzy nowotworowe. Blokowanie białek STAT w tych komórkach powoduje spadek potencjału proliferacyjnego oraz zwiększony odsetek komórek wchodzących w apoptozę.

Konstytutywna aktywacja białek STAT w poszczególnych nowotworach może wynikać z autokrynnej czy parakrynnej stymulacji komórki przez cytokiny lub czynniki wzrostu [66,73,80], nadmiernej aktywacji receptora [57,98], mutacji genu STAT wywołującej upośledzenie jego inaktywacji [70] czy nadmiernej aktywności kinaz JAK lub innych kinaz komórkowych, mogących fosforylować białka STAT [11,25,45]. W komórkach AML, wykazujących konstytutywną aktywację jednego z białek STAT, stwierdzono jego mutację punktową powodującą zmianę jednego z aminokwasów na



RYCINA 5. Wzrost klonogenny komórek ustalonej linii białaczkowej K562 po 24 h inkubacji z oligomerami antysensowymi (dawka w godzinie 0: 100 $\mu\text{g/ml}$; po 18 godz.: 50 $\mu\text{g/ml}$): K – grupa kontrolna (komórki nieinkubowane z oligomerami antysensowymi), A – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji antysensu dla STAT5A, Scr – komórki inkubowane z oligomerem o sekwencji nieblokującej (ang. *scrambled*); wyniki wyrażono w wartościach względnych przy przyjęciu wartości dla kontroli za 100%

tyrozynę. Nie wiadomo jednak, czy mutacja ta odpowiada za aktywację białka STAT [18].

Nieprawidłową aktywację białek STAT obserwowano w komórkach transfekowanych onkogenami: Src, Abl oraz genami fuzyjnymi charakteryzującymi się nadmierną aktywnością kinaz: Bcr/Abl, Tel-Jak2, Tel/Abl [72], Tel/PDGFR i NPM/Alk [62]. Również wirusy onkogenne mogą odgrywać rolę w nieprawidłowej aktywacji białek STAT i leukemogenezie. Limfocyty T zainfekowane HTLV-1, za sprawą białka wirusowego p12, przyłączającego się do cytoplazmatycznej części receptora dla IL-2, stają się IL-2 niezależne i wykazują nadmierną aktywację STAT5, co uważa się za przyczynę powstania T-ALL [61]. Onkogeny wirusowe v-Abl i v-Src [12], v-Eyk i wiele innych są również odpowiedzialne za aktywację czynników transkrypcyjnych STAT [7,8,25].

Od dawna uważa się, że przyczyną CML jest translokacja wzajemna t(9;22), prowadząca do powstania chromosomu Filadelfia oraz genu fuzyjnego Bcr/Abl. Produkt tego genu – p210^{Bcr/Abl} wykazuje nadmierną aktywność kinazy tyrozynowej, co powoduje konstytutywną aktywację STAT5 w komórkach hematopoetycznych bezpośrednio bez udziału kinazy JAK [14,20,26,78]. Transfekcja Bcr/Abl do komórek mysiej nie-

leukemicznej linii hematopoetycznej Ba/F3 powoduje jej transformację i uniezależnienie od IL-3 [77,78]. Bcr/Abl zmniejsza odsetek komórek wchodzących w apoptozę poprzez wzrost ekspresji genu kodującego białko antyapoptotyczne Bcl-x_L, co prowadzi do nagromadzenia komórek białaczkowych. W promotorze genu Bcl-x_L stwierdzono obecność kilku miejsc wiążących białko STAT5. [26,75]. Bcr/Abl aktywuje w komórkach wiele szlaków przekaźnikowych, takich jak: Ras, PI3K, JUN, c-Myc, co może dodatkowo zwiększać żywotność komórek nowotworowych [20,77]. Konstytutywną aktywację STAT5 stwierdza się w liniach hematopoetycznych z obecną rearanżacją Bcr/Abl, u pacjentów z CML z chromosomem Ph, ale również u pacjentów z ALL, u których ten chromosom jest wykrywany.

W przypadku ALL stwierdzono translokację t(9:12), odpowiedzialną za powstanie fuzji genu kodującego czynnik transkrypcyjny Tel z genem kodującym kinazę JAK [72,91,94]. Obecność Tel-JAK2 prowadzi do konstytutywnej fosforylacji białka STAT5 przez nadmierną aktywność kinazy. Fuzja Tel-Jak2 jest więc wystarczającym uwarunkowaniem do tego, ażeby komórki Ba/F3 zależne od IL-3 stały się niezależne od wpływu czynników wzrostu. Obecność genu Tel-JAK2 odnotowano u pacjentów z B-ALL i T-ALL, jak i u pacjentów z nietypowymi postaciami CML.

Konstytutywną aktywację białek STAT5 zaobserwowano także w komórkach pochodzących od niektórych pacjentów z ostrą białaczką szpikową [30,47]. Badania przeprowadzone u tych chorych wykazały dodatkowo, poza obecnością konstytutywnej fosforylacji białka STAT5, postaci β tego białka, tzn. izoformy pozbawione kilku aminokwasów z końca karboksylowego łańcucha białka. Wyjątkowo duża ich ilość u pacjentów z AML (około 80%) sugeruje udział krótszych form białek STAT5 w leukemogenezie [28,93,94]. Porównując obecność poszczególnych postaci białek przed leczeniem i w momencie nawrotu choroby okazuje się, że w momencie nawrotu choroby ilość pacjentów mających izoformę β znacznie się zwiększyła. Powstanie postaci β jest wynikiem innego *splicingu* mRNA lub częściej – odmiennej proteolizy białek STAT [54,64,93,94]. Izofomy β białek STAT powstają we wczesnych hematopoetycznych komórkach progenitorowych, pod wpływem proteazy serynowej i mogą uczestniczyć w procesie dojrzewania komórek krwiotwórczych linii mieloidalnej [15,43,54,64,65,93]. Prawdopodobnie formy te, jako dominujące, hamują przekaźnictwo przez białka STAT i mogą hamować, zależne od cytokin i regulowane przez formy α, różnicowanie komórek [93]. Mechanizm działania postaci β białek STAT nie jest jednak do końca wyjaśniony.

U części pacjentów z ostrą białaczką promielocytową (M3 wg klasyfikacji FAB) stwierdzono obecność fuzji genu STAT5b z RARA (ang. *retinoic acid receptor alpha*), który zwykle występuje w konstelacji z genem białaczki promielocytowej i odpowiedzialny jest za jej powstawanie [4,22,51]. Jest to pierwszy opisany przypadek występowania zmian strukturalnych w genie kodującym białka STAT w nowotworze u człowieka.

Podsumowując, konstytutywną aktywację STAT5 stwierdzono w komórkach białaczkowych CML, ALL i AML, jak i w skórnym chłoniaku T komórkowym [66]. Nadmierna aktywność STAT5 prowadzi do uniezależnienia komórek hemato-

poetycznych od czynników wzrostu. Wiele problemów pozostaje jednak do wyjaśnienia. Nieznany jest mechanizm, za pomocą którego komórki z konstytutywną aktywacją STAT5 ulegają apoptozie po ich stymulacji czynnikami wzrostu [63]. Ponieważ myszy STAT5ab^{-/-} są w takim samym stopniu wrażliwe na transformację v-Abl oraz Bcr/Abl jak typ „dziki”, rola białek STAT5 w procesie leukemogenezy wciąż wymaga dalszych badań [76].

IMPLIKACJE TERAPEUTYCZNE

Dokładne poznanie roli przekaźników sygnału oraz aktywatorów transkrypcji – STAT może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych oraz mniej toksycznych strategii leczniczych wykorzystujących zdobycze biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Nowe metody leczenia są interesujące przede wszystkim z punktu widzenia chorób nowotworowych. Zależnie od przyczyny nadmiernej aktywności białek STAT w przyszłości prawdopodobnie będzie można zastosować różne metody terapeutyczne. W przypadku wzmożonej ekspresji receptorów na powierzchni komórki nowotworowej możliwe jest zastosowanie antagonistów receptora, czyli cząstek o budowie podobnej do ligandu, wykazujących wysokie powinowactwo do receptora, jednak nie mających zdolności jego aktywacji [3]. W tym przypadku istnieje także możliwość wykorzystania przeciwciał neutralizujących przeciwko danemu białku receptorowemu. Należy jednak liczyć się z faktem, iż przeciwciała jako białka, które ulegną strawieniu w przewodzie pokarmowym osoby leczonej, muszą być podawane dożylnie. Istnieje ponadto ryzyko indukcji odpowiedzi immunologicznej w organizmie przeciwko obcemu białku, co może prowadzić do znaczącego obniżenia ich skuteczności. Jedną z najbardziej obiecujących metod terapeutycznych wydaje się być obecnie stosowanie inhibitorów kinaz tyrozynowych i serynowych, w przypadku stwierdzenia nadmiernej aktywności STAT [53]. Istnieją doniesienia traktujące o tym, iż zastosowanie inhibitorów kinaz zmniejsza potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych. W ostatnim czasie do obowiązków schematów terapii CML u pacjentów z obecnością chromosomu Ph wprowadzono inhibitor kinazy Bcr/Abl- STI571. Odpowiada on zarówno za hematologiczną, jak i cytogenetyczną remisję przewlekłej białaczki szpikowej [17,37,69].

Cel, jakim jest zmniejszenie aktywności czynników transkrypcyjnych STAT, można byłoby osiągnąć dzięki mechanizmom fizjologicznym odpowiedzialnym za ich dezaktywację w komórce. Niezbędne do tego jest jednak dogłębne poznanie roli fosfataz oraz protein rodziny CIS i PIAS, co umożliwiłoby skonstruowanie białka swoiście dezaktywującego STAT [69].

Kolejna potencjalna strategia lecznicza wiąże się ze stworzeniem mutantów STAT o charakterze dominującym, które łącząc się z białkiem komórkowym upośledzałyby jego przyłączanie do miejsca na receptorze, powstawanie dimerów, transport do jądra czy łączenie się z DNA. Mutanty takie mogłyby mieć tyrozyne zastąpioną fenyloalaniną,

zmodyfikowaną domenę odpowiadającą za wiązanie się z DNA lub nie miałyby końca karboksylowego białka [82].

Możliwe jest także blokowanie białek STAT na poziomie DNA czy mRNA przez zastosowanie oligomerów antysensowych (ODNs – ang. *oligodeoxynucleotides*) [27,50,67,68]. Pomimo silnych podstaw teoretycznych, poważną wadą tej metody jest w chwili obecnej ich duża toksyczność oraz możliwość nieswoistego przyłączania się antysensów do innych fragmentów genomu. Oprócz tego należałoby wziąć również pod uwagę konieczność częstego powtarzania podawania pacjentom ODNs ze względu na możliwość odłączenia od blokowanych sekwencji oraz stosunkowo wysoką cenę. W odpowiedzi na wymienione ograniczenia szerszego stosowania oligomerów antysensowych, opracowano koncepcję trwałego zniszczenia mRNA przez niewielkie fragmenty RNA o właściwościach katalitycznych – rybozymy [96]. Wielkie nadzieje wiąże się z użyciem rybozymów do hamowania ekspresji genów przez rozcinanie określonych cząsteczek mRNA w warunkach *in vivo* [27,46,52,79,87]. Krótkie fragmenty DNA o budowie semipalindromowej miałyby również zastosowanie w „przechwytywaniu” aktywnych postaci białek STAT.

Poza nowotworami istnieje możliwość zastosowania metod biologii molekularnej w innych jednostkach chorobowych z domniemaną przyczyną leżącą w nieprawidłowym funkcjonowaniu białek STAT. Pośród tej grupy schorzeń, wynikającej z nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej, można wskazać choroby alergiczne oraz autoimmunologiczne. W obydwóch przypadkach skuteczne zablokowanie ekspresji STAT mogłoby znacząco poprawić efekty leczenia osiągnane do tej pory jedynie terapią konwencjonalną [59,75,88].

Dogłębne poznanie i zrozumienie roli białek STAT, a zwłaszcza w patogenezie chorób rozrostowych jest szczególnie istotne w ich prewencji i skutecznej terapii. Białka STAT, jako cel terapii genowej, są szczególnie atrakcyjne, bowiem zablokowanie ich funkcji nie byłoby prawdopodobnie szkodliwe dla innych komórek. Częściowa inhibicja tych białek wydaje się być wystarczająca dla zahamowania procesu chorobowego, a pozostała aktywność może zapewnić zdrowym tkankom prawidłowe funkcjonowanie [69].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AARONSON DS, HORVATH CM. A Road Map for Those Who Don't Know JAK-STAT. *Science* 2002; 296: 1653–1655.
- [2] AKIRA S. Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. *Stem Cells* 1999; 17: 138–146.
- [3] ALAS S, BONAVIDA B. Rituximab Inactivates Signal Transducer and Activation of Transcription 3 (STAT3) Activity in B-Non-Hodgkin's Lymphoma through Inhibition of the Interleukin 10 Autocrine/Paracrine Loop and Results in Down-Regulation of Bcl-2 and Sensitization to Cytotoxic Drugs. *Cancer Res* 2001; 61: 5137–5144.
- [4] ARNOULD C, PHILIPPE C, BOURDON V, GREGOIRE MJ, BERGER R, JONVEAUX P. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1741–1749.

- [5] BARBER D, BEATTIE BK, MASON JM, NGUYEN M, YOAKIM M, NEEL BG, D'ANDREA AD, FRANK DA. A common epitope is shared by activated signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) and the phosphorylated erythropoietin receptor: implications for the docking model of STAT activation. *Blood* 2001; **97**: 2230–2237.
- [6] BENEKLI M, XIA Z, DONOHUE KA, FORD LA, PIXLEY LA, BAER MR, BAUMANN H, WETZLER M. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood* 2002; **99**: 252–257.
- [7] BESSER D, BROMBERG JF, DARNELL JE, HANAFUSA H. A single amino acid substitution in the v-Eyk intracellular domain results in activation of Stat3 and enhances cellular transformation. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1401–1409.
- [8] BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, JOVE R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; **19**: 2474–2488.
- [9] BRENDER Ch, NIELSEN M, KALTOFT K, MIKKELSEN G, ZHANG Q, WASIK M, BILLESTRUP N, ODUM N. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2001; **97**: 1056–1062.
- [10] BRIZZI M.F, DENTELLI P, ROSSO A, YARDEN Y, PEGORARO L. STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J Biol Chem* 1999; **274**: 16965–16972.
- [11] BROMBERG J, DARNELL JE jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; **19**: 2468–2473.
- [12] BROMBERG JF, HORVATH CM, BESSER D, LATHAM WW, DARNELL JE jr. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 2553–2558.
- [13] BUNTING KD, BRADLEY HL, HAWLEY TS, MORIGGL R, SORRENTINO BP, IHLE JN. Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. *Blood* 2002; **99**: 479–487.
- [14] CARLESSO N, FRANK DA, GRIFFIN JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 1996; **183**: 811–820.
- [15] CHAKRABORTY A, DYER KF, TWEARDY DJ. Delineation and Mapping of STAT5 Isoforms Activated by Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Myeloid Cells. *Blood Cells Mol Dis* 2000; **26**: 320–330.
- [16] CHIDA D, MIURA O, YOSHIMURA A, MIYAJIMA A. Role of cytokine signaling molecules in erythroid differentiation of mouse fetal liver hematopoietic cells: functional analysis of signaling molecules by retrovirus-mediated expression. *Blood* 1999; **93**: 1567–1578.
- [17] CHUNRONG Y, KRYSTAL G, VARTICOVSKI L, MCKINSTRY R, RAHMANI M, DENT P, GRANT S. Pharmacologic Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase/ Mitogen-activated Protein Kinase Inhibitors Interact Synergistically with ST1571 to Induce Apoptosis in Bcr/Abl-expressing Human Leukemia Cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 188–199.
- [18] COFFER PJ, KOENDERMAN L, de GROOT RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 2000; **19**: 2511–2522.
- [19] DARNELL J. STATs and gene regulation. *Science* 1997; **277**: 1630–1635.
- [20] de- GROOT RP, RAAIJMAKERS J, LAMMERS J, JOVE R, KOENDERMAN L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 1999; **94**: 1108–1112.
- [21] DONG F, LARNER AC. Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood* 2000; **95**: 1656–1662.
- [22] DONG S, TWEARDY DJ. Interactions of STAT5b-RAR α , a novel acute promyelocytic leukemia fusion protein, with retinoic acid receptor and STAT3 signaling pathways. *Blood* 2002; **99**: 2637–2646.
- [23] DURBIN JE, HACKENMILLER R, SIMON MC, LEVY DE. Targeted Disruption of the Mouse Stat1 Gene Results in Compromised Innate Immunity to Viral Disease. *Cell* 1996; **84**: 443–450.
- [24] ERIKSEN KW, KALTOFT K, NIELSEN M, ZHANG Q, GEISLER C, NISSEN MH, ROPKE C, WASIK MA, ODUM N. Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia* 2001; **15**: 787–793.
- [25] GARCIA R, YU CL, HUDNALL A, CATLETT R, NELSON KL, SMITHGALL T, FUJITA DJ, ETHIER SP, JOVE R. Constitutive activation of Stat3 in fibroblast transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1997; **8**: 1267–1276.
- [26] GESBERT F, GRIFFIN JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 2000; **96**: 2269–2276.

- [27] GEWIRTZ AM. Oligonucleotide therapeutics: clothing the emperor. *Curr Opin Mol Ther* 1999; **1**: 297–306.
- [28] GOUILLEUX-GRUART V, GOUILLEUX F, DESAINT C, CLAISSE JF, CAPIOD JC, DELOBEL J, WEBER-NORDT R, DUSANTER-FOURT I, DREYFUS F, GRONER B, PRIN L. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 1996; **87**: 1692–1697.
- [29] GRIMLEY PM, DONG F, RUI H. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; **10**: 131–157.
- [30] HAYAKAWA F, TOWATARI M, IIDA H, WAKAO H, KIYOI H, NAOE T, HIDEHIKO S. Differential constitutive activation between STAT-related and neutrophil proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1998; **101**: 521–528.
- [31] HILL CS, TREISMAN R. Transcriptional Regulation by Extracellular Signals: Mechanisms and Specificity. *Cell* 1995; **80**: 199–211.
- [32] IHLE JN. STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell* 1996; **84**: 331–334.
- [33] IHLE JN. Cytokine receptor signaling. *Nature* 1995; **377**: 591–594.
- [34] ILARIA RL, HAWLEY RG, VAN ETEN RA. Dominant Negative Mutants Implicate STAT5 in Myeloid Cell Proliferation Differentiation. *Blood* 1999; **93**: 4154–4166.
- [35] IMADA K, LEONARD WJ. The Jak-Stat pathway. *Mol Immunology* 2000; **37**: 1–11.
- [36] ISRAELS L, ISRAELS E. Apoptosis. *Stem Cells* 1999; **17**: 306–313.
- [37] JĘDRZEJCZAK WW. Inhibitor kinazy tyrozynowej (STI-571) w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej i ostrej białaczki limfoblastycznej Ph dodatniej. *Współczesna Onkologia* 2001; **5**: 140–144.
- [38] KAGAMI S, NAKAJIMA H, KUMANO K, SUZUKI K, SUTO A, IMADA K, DAVEY HW, SAITO Y, TAKATSU K, LEONARD WJ, IWAMOTO I. Both Stat5a and Stat5b are required for antigen-induced eosinophil and T-cell recruitment into the tissue. *Blood* 2000; **95**: 1370–1377.
- [39] KAWIAK J, HOSER G, SKÓRSKI T. Apoptosis and some of its medical implications. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 99–110.
- [40] KIESLINGER M, WOLDMAN I, MORIGGL R, HOFMANN J, MARINE JC, IHLE JN, BEUG H, DECKER T. Antiapoptotic activity of STAT5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev* 2000; **14**: 232–244.
- [41] KIRITO K, NAKAJIMA K, WATANABE T, UCHIDA M, TANAKA M, OZAWA K, KOMATSU N. Identification of the human erythropoietin receptor region required for STAT1 and STAT3 activation. *Blood* 2002; **99**: 102–110.
- [42] KUBE D, HOLTICK U, VOCKERODT M, AHMADI T, HAIER B, BEHRMANN I, HEINRICH PC, DIEHL V, TESCH H. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* 2001; **98**: 762–768.
- [43] LEE C, PIAZZA F, BRUTSAERT S, VALENS J, STREHLOW I, JAROSINSKI M, SARIS C, SCHINDLER C. Characterization of the Stat5 protease. *J Biol Chem* 1999; **274**: 26767–26775.
- [44] LEONARD WJ, LIN JX. Cytokine receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **105**: 877–888.
- [45] LEONARD WJ, O'SHEA JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 293–322.
- [46] LEWIN AS, HAUSWIRTH WW. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 221–228.
- [47] LIU RY, FAN C, GARCIA R, JOVE R, ZUCKERMAN KS. Constitutive activation of the JAK2/STAT5 signal transduction pathway correlates with growth factor independence of megakaryocytic leukemic cell lines. *Blood* 1999; **93**: 2369–2379.
- [48] LORD JD, McINTOSH BC, GREENBERG PD, NELSON BH. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the transactivation domain of Stat5. *J Immunol* 2000; **164**: 2533–2541.
- [49] MARTINO A, HOLMES JH, LORD JD, MOON JJ, NELSON BH. Stat5 and SP1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol* 2001; **166**: 1723–1729.
- [50] MATYSIAK W, GÓRSKI A. Perspektywy terapii antysensowej. *Pol Arch Med Wewn* 1996; **96**: 84–88.
- [51] MAURER AB, WICHMANN C, GROSS A, KUNKEL H, HEINZEL T, RUTHARDT M, GRONER B, GREZ M. The STAT5-RAR α fusion protein represses transcription and differentiation through interaction with a corepressor complex. *Blood* 2002; **99**: 2647–2652.

- [52] MENDOZA-MALDONADO R, ZENTILIN L, FANIN R, GIACCA M. Purgine of chronic myelogenous leukemia cells by retrovirally expressed anti-bcr-abl ribozymes with specific cellular compartmentalization. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 71–86.
- [53] MEYDAN N, GRUNBERGER T, DADI H, SHAHAR M, ARPAIA E, LAPIDOT Z, LEEDER JS, FREEDMAN M, COHEN A, GAZIT A, LEVITZKI A, ROIFMAN CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 1996; **379**: 645–648.
- [54] MEYER J, JUCKER M, OSTERTAG W, STOCKING C. Carboxyl-truncated STAT5beta is generated by a nucleus-associated serine protease in early hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; **91**: 1901–1908.
- [55] MILLOT G, SVINARCHUK F, LACOUT C, VAINCHENKER W, DUMENIL D. The granulocyte colony-stimulating factor receptor supports erythroid differentiation in the absence of the erythropoietin receptor or STAT5. *Br J Haematol* 2001; **112**: 449–58.
- [56] MIYOSHI K, SHILLINGFORD JM, SMITH GH, GRIMM SL, WAGNER KU, OKA T, ROSEN JM, ROBINSON GW, HENNIGHAUSEN L. Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* 2001; **155**: 531–542.
- [57] MIZUKI M, FENSKI R, HALFTER H, MATSUMURA I, SCHMIDT R, MULLER C, GRUNDIG W, KRATZ-ALBERS K, SERVE S, STEUR C, BUCHNER T, KIENAST J, KANAKURA Y, BERDEL WE, SERVE H. Flt-3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000; **96**: 3907–3914.
- [58] MORIGGL R, TOPHAM DJ, TEGLUND S, SEXL V, MCKAY C, WANG D, HOFFMEYER A, van DEURSEN J, SANGSTER MY, BUNTING KD, GROSVELD GC, IHLE JN. Stat5 is required for IL-2- induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 1999; **10**: 249–259.
- [59] MULLINGS RE, WILSON SJ, PUDDICOMBE SM, LORDAN JL, BUCCHIERI F, DJUKANOVIC R, HOWARTH PH, HARPER S, HOLGATE ST, DAVIES DE. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **108**: 832–838.
- [60] NAKIJIMA H, BRINDLE PK, HANDA M, IHLE JN. Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *EMBO J* 2001; **20**: 6836–6844.
- [61] NICOT C, MULLOY JC, FERRARI MG, JOHNSON JM, FU K, FUKUMOTO R, TROVATO R, FULLEN J, LEONARD WJ, FRANCHINI G. HTLV-1 p12' protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 2001; **98**: 823–829.
- [62] NIEBOROWSKA- SKÓRSKA M, SŁUPIANEK A, XUE L, ZHANG Q, RAGHUNATH PN, HOSER G, WASIK MA, MORRIS SW, SKÓRSKI T. Role of Signal Transducer and Activator of Transcription 5 in Nucleophosmin/Anaplastic Lymphoma Kinase-mediated Malignant Transformation of Lymphoid Cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 6517–6523.
- [63] NOSAKA T, KAWASHIMA T, MISAWA K, IKUTA K, MUI A, KITAMURA T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J* 1999; **18**: 4754–4759.
- [64] ODA A, WAKAO H, FUJITA H. Calpain is a signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and STAT5 protease. *Blood* 2002; **99**: 1850–1853.
- [65] PIAZZA F, VALENS J, LAGASSE E, SCHINDLER C. Myeloid differentiation of FdCPl cells is dependent on STAT5 processing. *Blood* 2000; **96**: 1358–1365.
- [66] QIN JZ, KAMARASHEV J, ZHANG CL, DUMMER R, BURG G, DOBBELING U. Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol* 2001; **117**: 583–589.
- [67] RATAJCZAK MZ, SKÓRSKI T, BIAŁEK A. Perspektywy wykorzystania strategii oligomerów antysensowych w medycynie klinicznej. *Biotechnologia* 1995; **1**: 36–42.
- [68] RATAJCZAK MZ. Perspektywy wykorzystania osiągnięć biotechnologii, biologii molekularnej oraz inżynierii komórkowej we współczesnej hematologii. *Pol Arch Med Wewn* 1994; **92**: 373–379
- [69] RAVANDI F, TALPAZ M, KANTARJIAN H, ESTROV Z. Review – Cellular signaling pathways: new targets in leukaemia therapy. *Br J Haematol* 2002; **116**: 57–77.
- [70] RODER S, STEIMLE C, MEINHARDT G, PAHL HL. STAT3 is constitutively active in some patients with *Polycythemia rubra vera*. *Exp Haematol* 2001; **29**: 694–702.

- [71] RUPNIEWSKA Z, ROŻYŃKOWA D, KUROWSKA M. Rodzina genów bcl-2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 33–47.
- [72] SANTOS SC, LACRONIQUE V, BOUCHAERT I, MONNI R, BERNARD O, GISSELBRECHT S, GUILLEUX F. Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3- kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene* 2001; **20**: 2080–2090.
- [73] SCHURINGA JJ, WIERENGA ATJ, KRUIJER W, VELLENGA E. Constitutive STAT3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood* 2000; **95**: 3765–3770.
- [74] SCHWALLER J, PARGANAS E, WANG D, CAIN D, ASTER JC, WILLIAMS IR, LEE CK, GERTHNER R, KITAMURA T, FRANTSVE J, ANASTASIADOU E, LOH ML, LEVY DE, IHLE JN, GILLILAND DG. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell* 2000; **6**: 693–704.
- [75] SEIDEL HM, LAMB P, ROSEN J. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. *Oncogene* 2000; **19**: 2645–2656.
- [76] SEXL V, PIEKORZ R, MORIGGL R, ROHRER J, BROWN MP, BUNTING KD, RPTHAMMER K, ROUSSEL MF, IHLE JN. Stat5ab^{-/-} contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood* 2000; **96**: 2277–2283.
- [77] SHUAI K, HALPERN J, HOEVE J, RAO X, SAWYERS CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 1996; **13**: 247–254.
- [78] SILLABER C, GESBERT F, FRANK DA, SATTLER M, GRIFFIN JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000; **95**: 2118–2125.
- [79] SIOUD M. Nucleic acid enzymes as a novel generation of anti-gene agents. *Curr Mol Med* 2001; **1**: 575–588.
- [80] SKINNIDER BF, ELIA AJ, GASCOYNE RD, PETTERSON B, TRUMPER L, KAPP U, MAK TW. Signal Transducer and Activator of Transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; **99**: 618–626.
- [81] SKÓRSKI T, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, WŁODARSKI P, PERROTTI D, HOSER G, KAWIAK J, MAJEWSKI M, CHRISTENSEN L, IOZZO RV, CALABRETTA B. Treatment of Philadelphia leukemia in severe combined immunodeficient mice by combination of cyclophosphamide and bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides. *J Nat Cancer Inst* 1997; **87**: 124–133.
- [82] SMITHGALL TE, BRIGGS SD, SCHREINER S, LERNER EC, CHENG H, WILSON M. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 2000; **19**: 2612–2618.
- [83] SNOW JW, ABRAHAM N, MA MC, ABBEY NW, HERNDIER B, GOLDSMITH MA. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development *in vivo* through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2002; **99**: 95–101.
- [84] SOCOLOVSKY M, FALLON AE, WANG S, BRUGNARA C, LODISH HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999; **98**: 181–191.
- [85] SOCOLOVSKY M, NAM H, FLEMING MD, HAASE VH, BRUGNARA C, LODISH HF. Ineffective erythropoiesis in STAT5a^{+/+}5b^{-/-} mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 2001; **98**: 3261–3273.
- [86] TEGLUND S, McKAY C, SCHUETZ E, van DEURSEN JM, STRAVOPODIS D, WANG D, BROWN M, BODNER S, GROSVELD G, IHLE JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant roles in cytokine responses. *Cell* 1998; **29**: 841–850.
- [87] TURKER PC. Biologia molekularna – krótkie wykłady. PWN 1999.
- [88] TURKSON J, JOVE R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000; **19**: 6613–6626.
- [89] VERDIER F, CHRETIEN S, MULLER O, VARLET P, YOSHIMURA A, GISSELBRECHT S, LACOMBE C, MAYEUX P. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28185–28190.
- [90] WANG D, MORIGGL R, STRAVOPODIS D, CARPINO N, MARINE JC, TEGLUND S, FENG J, IHLE JN. A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated STAT5. *EMBO J* 2000; **19**: 392–399.

- [91] WARD A, TOUW I, YOSHIMURA A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000; **95**: 19–26.
- [92] WEBER- NORDT RM, MERTELSMANN R, FINKE J. The JAK-STAT Pathway: Signal Transduction Involved in Proliferation, Differentiation and Transformation. *Leuk Lymphoma* 1998; **28**: 459–467.
- [93] XIA Z, SALZLER RR, KUNZ DP, BAER MR, KAZIM L, BAUMANN H, WETZLER M. A novel Serine-dependent Proteolytic Activity Is Responsible for Truncated Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins in Acute Myeloid Leukemia Blasts. *Cancer Res* 2001; **61**: 1747–1753.
- [94] XIA Z, SAIT NJ, BAER MR, BARCOS M, DONOHUE KA, LAWRENCE D, FORD LA, BLOCK AMW, BAUMANN H, WETZLER M. Truncated STAT proteins are prevalent at relapse of acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2001; **25**: 473–482.
- [95] YU CL, LIN YJ, BURAKOFF SJ. Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 599–604.
- [96] ZABEL M. Rybozomy I gRNA. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 276–278.
- [97] ZHANG S, FUKUDA S, LEE Y, HANGOC G, COOPER S, SPOLSKI R, LEONARD WJ, BROXMEYER HE. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med* 2000; **192**: 719–728.
- [98] ZHI-QIANG N, LI J, ARCECI RJ. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 activation is required for Asp⁸¹⁶ mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* 2001; **97**: 3559–3567.
- [99] ZIEMIECKI A, HARPUR AG, WILKS AF. Jak protein tyrosine kinases: their role in cytokine signaling. *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 207–212.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 29.04.2002 r.

Przyjęto: 20.06.2002 r.

70-112 Szczecin, ul. Czestochowska 8/17

UDZIAŁ cGMP W SZLAKACH TRANSDUKCJI SYGNAŁÓW W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH*

THE ROLE OF cGMP IN SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IN PLANT CELLS

Monika SZALATY

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM
Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Poznań

Streszczenie: Cykliczny GMP jest jednym z kluczowych wtórnych przekazywaczy, funkcjonującym w wielu szlakach transdukcji sygnału w systemach zwierzęcych. Badania nad rolą cGMP w komórkach roślinnych trwają zaledwie jedną dekadę i wskazują, że cząsteczka ta jest znaczącym elementem w przekazywaniu wewnątrzkomórkowym roślin. Wykazano, że cGMP bierze udział w szlaku leżącym u podstaw reakcji obronnej HR, szlaku zależnym od fitochromu oraz reakcjach niezbędnych w regulacji aparatów szparkowych roślin. Podobnie jak u zwierząt, również u roślin induktorami sygnału cGMP wydaje się być NO i peptydy natriuretyczne. Pomimo że znanych jest wiele zwierzęcych cyklaz guanylanowych, jak dotąd nie zidentyfikowano układu generującego cGMP u roślin.

Słowa kluczowe: cykliczny GMP, cyklaza guanylanowa, tlenek azotu, rośliny.

Summary: Cyclic GMP is a one of the key secondary messengers, acting in many signal transduction pathways in animals. Studies on cGMP role in plant cells last only a decade and indicate that it is a significant element in plant signal transduction system. It was shown that cGMP is involved in the mechanism of defense signaling pathway of HR, phytochrome signal transduction pathway and in the modulation of guard cell system in plants. Similarly as in animals, NO and natriuretic peptides seem to be inducers of cGMP signal in plants too. Despite of many known animal guanylate cyclases, no cGMP generating system was identified in plants till now.

Key words: cyclic GMP, guanylate cyclase, nitric oxide, plants.

Wykaz skrótów: ANP – przedsionkowy peptyd sodopędny; CAB – białko wiążące chlorofil a,b; cADPR – cykliczna ADP-ryboza; cGMP – cykliczny-3',5'-guanozynomonofosforan; CHS – syntaza chalkonowa; FNR – oksydoreduktaza ferrodoksyna-NADP⁺; GC – cyklaza guanylanowa; HR – reakcja nad-

*Praca dofinansowana z pieniędzy statutowych Zakładu.

wrażliwości; **irPNP** – roślinne peptydy natriuretyczne; **NO** – tlenek azotu; **NOS** – syntaza tlenku azotu; **PAL** – amoniakolizacja fenylalaninowa; **PR-1** – białka związane z patogenezą; **ROI** – reaktywne formy tlenu

1. WSTĘP

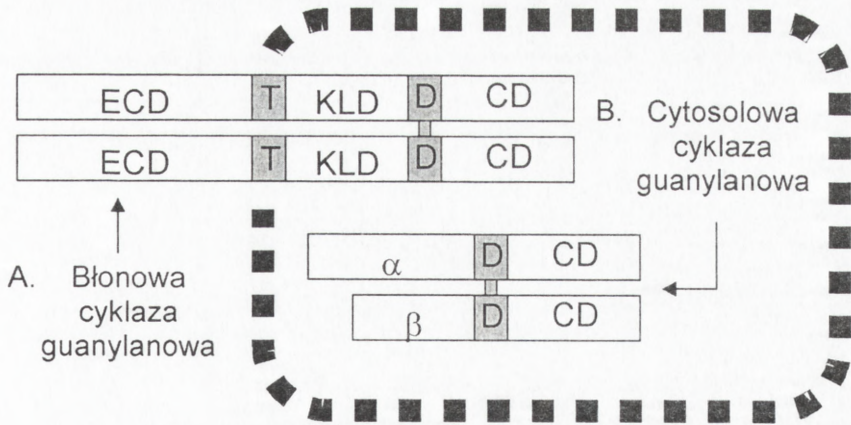
Mechanizmy, za pomocą których zewnątrzkomórkowe sygnały wywołują specyficzną odpowiedź biologiczną, są istotne dla regulacji wszystkich funkcji komórki. Każda komórka, niezależnie od tego, czy jest samodzielnym organizmem, czy tylko elementem złożonego organizmu wielokomórkowego, musi mieć zdolność odbierania niezliczonej liczby stale napływających sygnałów i reagowania na wybrane spośród nich. W uproszczeniu polega to na percepcji sygnału zewnętrznego przez odpowiednie receptory błonowe, które aktywują wtórne sygnały komórkowe w cytosolu, a te z kolei modyfikują aktywność cząsteczek efektorowych.

W tej pracy opisano funkcjonowanie cyklicznego 3',5'-guanozynomonofosforanu (cGMP), który jest przedstawicielem grupy wtórnych przekaźników informacji. Istnienie tych przekaźników umożliwia przemianę sygnału zewnętrznego w formę rozpoznawaną przez efektor, amplifikację sygnału oraz wyciszenie reakcji. Ponadto ważną cechą wtórnych przekaźników jest ich udział w interakcjach odrębnych szlaków transdukcji sygnałów w komórce (*cross-talk*).

Szczególnie ostatnia dekada wiąże się z napływem informacji dotyczących pochodzenia oraz funkcji cGMP w komórkach ssaków. Właśnie te informacje stały się punktem wyjścia dla badań nad cGMP w systemach roślinnych. Zagadnienia te zostały omówione w niniejszej pracy.

2. GENEROWANIE ORAZ FUNKCJONOWANIE cGMP W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH

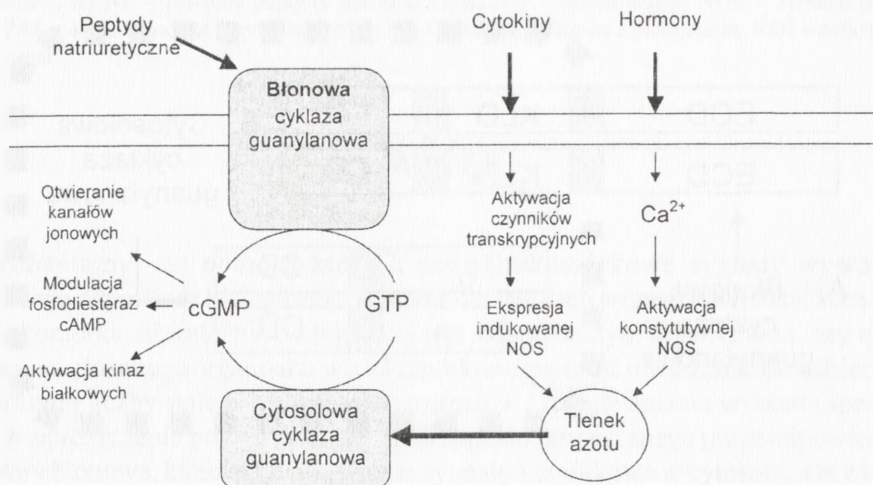
Istnienie cGMP odkryto niespełna czterdzieści lat temu. Asham i wsp. [2] opisali jego obecność w moczu szczura. Kilka lat później odkryto w tkankach ssaków enzymy odpowiedzialne za produkcję cGMP [22,27,29,49,59]. Cyklazy guanylanowe (ang. *Guanylate Cyclases*, GC) w obecności jonów magnezu *in vivo* katalizują formowanie cGMP z GTP (guanozynotrifosforan) z jednoczesnym uwolnieniem PPi (pirofosforanu). U ssaków cyklazy guanylanowe występują jako enzymy cytosolowe (frakcji rozpuszczalnej – ang. *soluble Guanylate Cyclase*, sGC) lub związane z błonami komórkowymi (ang. *particulate Guanylate Cyclase*, pGC). Te dwa typy cyklaz, prócz lokalizacji komórkowej, różni też odmienna budowa (ryc. 1) oraz inne sposoby pobudzania ich aktywności enzymatycznej (ryc. 2).



RYCINA 1. A) **Model cyklazy błonowej**: analiza I-rzędowej struktury poznanych błonowych GC ujawniła istnienie następujących domen w ich strukturze: **ECD** – N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej odpowiedzialnej za wiązanie ligandów peptydowych, **T** – krótkiej domeny transbłonowej, **KLD** – cytoplazmatycznej domeny kinazopodobnej wiążącej ATP i aktywatory białkowe, **D** – domeny umożliwiającej dimeryzację i **CD** – C-końcowej domeny katalitycznej o najwyższym stopniu konserwatywności spośród wymienionych [19]; B) **Model cyklazy frakcji rozpuszczalnej**: cyklazy cytosolowe są heterodimerami zbudowanymi z podjednostek α i β różniących się długością oraz posiadającymi związaną grupę hemową. Dotąd zidentyfikowano po dwie izoformy każdej z podjednostek: α (α_1 i α_2) i β (β_1 i β_2) [34,62]. Każda z podjednostek zawiera w C-końcowej części domenę katalityczną – **CD**. Aktywne centrum katalityczne tworzone jest przez obie podjednostki, prawdopodobnie w wyniku ich dimeryzacji, za którą odpowiadają domeny oznaczone jako **D**, gdyż każda z osobna nie wykazuje aktywności enzymatycznej [47]. Wiązanie hemu i właściwości regulatorowe całego kompleksu są determinowane przez podjednostkę β [34]

Cyklazy guanylanowe zidentyfikowano również u innych kręgowców, a także u *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster* [5,53].

Dotąd zidentyfikowano u ssaków siedem izoform błonowych GC. Cyklazy A, B i G występują w różnych tkankach [47,51], cyklaza C w jelitach [58], cyklaza D w komórkach węchowych [18], cyklazy E i F w komórkach siatkówki [60]. Różne są mechanizmy regulacji błonowych cyklaz guanylanowych u ssaków. Aktywność cyklaz A i B regulowana jest przez ligandy peptydowe zwane natriuretycznymi [15,50]. Enzym GC-C aktywowany jest przez termostabilne enterotoksyny bakteryjne (np. *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *V. cholerae*). Biegunki, obserwowane przy bakteryjnych zatruciach pokarmowych, wiążą się ze stymulującym działaniem termostabilnej enterotoksyny (występującej w jadzie bakterii) na aktywność GC-C w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego i związaną z tym nadmierną akumulacją cGMP, czego skutkiem jest nasilenie wydzielania płynów. Są też cyklazy błonowe regulowane przez jony wapnia. Zalicza się do nich enzym występujący w segmentach zewnętrznych komórek fotoreceptorowych siatkówki kręgowców [24,25] oraz enzym występujący w rzęskach pierwotniaków *Paramecium* i *Tetrahymena* [33,48]. Cyklazy pierwotniaków aktywowane są przez jony wapnia za pośrednictwem kalmoduliny. W wapniozależnej regulacji aktywności enzymu fotoreceptorów siatkówki kręgowców pośredniczą białka



RYCINA 2. Schemat indukcji i funkcjonowania sygnału cGMP w komórkach zwierzęcych

nazwane GCAP (ang. *Guanylyl Cyclase Activating Protein*) [14,17,26]. Mechanizm regulacji oparty jest na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Przy stężeniu jonów wapnia przekraczającym 500 nM aktywność GC jest niska, a rośnie kilkunastokrotnie, gdy stężenie jonów wapnia spada poniżej 70 nM [25,26].

W komórkach ssaków cytosolowa GC jest receptorem dla tlenu azotu, cząsteczki sygnałowej, produkowanej w reakcji utleniania L-argininy do L-cytruliny katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (ang. *Nitric Oxide Synthase*, NOS).

Lokalne stężenie cGMP w komórce jest wypadkową procesów jego biosyntezy oraz degradacji, za którą odpowiadają fosfodiesterazy. Wypadkowy sygnał cGMP oddziałuje na odpowiednie cząsteczki efektorowe, którymi mogą być: kanały jonowe, np. zależne od cGMP kanały kationowe w fotorceptorowych komórkach siatkówki, fosfodiesterazy cAMP (cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu) – PDE2 aktywowana w wyniku związania cGMP lub PDE3 hamowana przez cGMP oraz kinazy białkowe regulowane przez cGMP – PKGI i PKGII (ryc. 2).

3. cGMP JEST CZĄSTECZKĄ SYGNAŁOWĄ RÓWNIEŻ W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Obecność cGMP w tkankach roślinnych została potwierdzona przez spektrometrię masową i metodami radioimmunologicznymi [10]. Pokazano, że czynniki takie, jak: kwas giberelinowy, światło i tlenek azotu, stymulują przejściowy wzrost poziomu cGMP odpowiednio w komórkach aleuronowych jęczmienia (*Hordeum vulgare*), komórkach fasoli (*Phaseolus vulgaris*), igłach świerku (*Picea* sp.) [10,41,42].

Dotychczas nie wyizolowano enzymu odpowiedzialnego za produkcję cGMP w komórkach roślinnych. W genomach roślinnych nie znaleziono żadnego genu kodującego cyklazę guanylanową o sekwencji nukleotydowej homologicznej do zidentyfikowanych dotychczas zwierzęcych GC. Dzięki szeroko zakrojonym badaniom farmakologicznym z użyciem analogów cGMP i inhibitorów specyficznych dla zwierzęcych cyklaz guanylanowych, można jedynie przypuszczać, że istnieje system generujący cGMP w komórkach roślinnych.

3.1. cGMP uczestniczy w szlaku NO-zależnym regulującym ekspresję genów kodujących białka reakcji obronnej roślin

Obecnie uważa się, że sygnał cGMP w roślinach bierze między innymi udział w reakcjach leżących u podstaw obronnej reakcji nadwrażliwości (ang. *Hypersensitive Response*, HR). Rozpoznanie przez roślinę awirulentnego organizmu patogennego wywołuje nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Intermediates*, ROI). Związki te indukują ekspresję wielu roślinnych genów wprzęgniętych w lokalne mechanizmy obronne określane łącznie reakcją HR [30,31]. W układzie immunologicznym ssaków, np. w makrofagach, unieszkodliwiających komórki bakteryjne czy nowotworowe, działaniu ROI towarzyszy tlenek azotu (ang. *Nitric Oxide*, NO). Delledonne i wsp. [13] postanowili sprawdzić, czy współdziałanie ROI z NO istnieje też w świecie roślin. W badaniach z wykorzystaniem kultury komórek soi (*Glycine max* cv. Williams 82) wykazali, że NO wzmacnia reakcję HR indukowaną przez ROI – umieralność komórek po użyciu NO obok H_2O_2 wzrasta nawet 5–10-krotnie. Poza tym NO niezależnie od ROI indukuje ekspresję genów kodujących białka reakcji obronnej np. genu amoniakolizazy L-fenylalaniny (ang. *Phenylalanine Ammonia-Lyase*, PAL), kodującej pierwszy enzym szlaku fenylpropanoidowego i genu syntazy chalkonowej (ang. *CHalcone Synthase*, CHS), kodującej pierwszy enzym łańcucha reakcji prowadzących do powstawania związków pochodnych flawonoidów. W komórkach soi, przy wzroście stężenia endogennego NO w odpowiedzi na infekcję komórek awirulentnym *P. syringae*, inhibitor zwierzęcej NOS znacząco redukował ekspresję genów PAL i CHS [13].

Komórki *Arabidopsis thaliana* var. *Landsberg erecta* w odpowiedzi na infekcję awirulentnym szczepem *P. syringae* też charakteryzują się wyższym poziomem NO. W przypadku kultury komórek rzodkiewnika stymulacja samym NO bez udziału ROI wystarczy, aby wywołać reakcję HR. W tych badaniach posunięto się jednak dalej, znów przez analogię do wyników badań na materiale zwierzęcym, gdzie w reakcjach stymulowanych przez NO uczestniczy wtórny przekaźnik cGMP, sprawdzono, czy sygnał ten uczestniczy również w reakcjach obronnych komórek rzodkiewnika. Użyto w tym celu specyficznego inhibitora cytosolowej cyklazy guanylanowej ssaków. Inhibitor ODQ (ang. *1H-(1,2,3)-OxaDiazole[4,3-a]Quinoxalin-1-one*) hamował rozwój reakcji HR indukowanej egzogennym NO. Stan ten można było odwrócić przez podanie do komórek 8-bromoguanozyno-3',5'-cyklicznego monofosforanu (8-Br-cGMP) – analogu cGMP. Sam 8-Br-cGMP, bez stymulacji egzogennym NO, nie wywoływał

reakcji HR, co świadczyć może o tym, że jego obecność jest niezbędna, choć niewystarczająca, aby zaindukować lokalną reakcję obronną [11].

Stymulujące działanie NO w indukcji ekspresji genów szlaków reakcji obronnej udokumentowali również Durner i wsp. [16]. Wykorzystując rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum*) oraz zawiesinę komórek tytoniu, autorzy wykazali, że w obu przypadkach infekcja wirusem TMV (mozaiki tytoniowej) powoduje 4–5-krotny wzrost aktywności NOS. Iniekcja zrekombinowanej zwierzęcej NOS do liści tytoniu wywoływała okresową ekspresję genów PAL oraz białek związanych z patogenezą (ang. *Pathogenesis Related 1 proteins*, PR-1). Chcąc poznać mechanizm, przez który NO stymuluje tę ekspresję, wykorzystano kultury zawieszinowe komórek tytoniu z tego względu, że łatwiej jest monitorować przejściową ekspresję w materiale relatywnie cytologicznie jednorodnym. Ponadto wykazano, że heterotroficzne komórki rosnące w ciemności wykazują niski poziom ekspresji genów, których produkty biorą udział w fotosyntezie i biosyntezie związków fenylopropanoidowych, jak PAL i CHS. Donory NO wprowadzone do zawiesiny komórkowej wywoływały indukcję ekspresji PAL i PR-1. Również 8-Br-cGMP indukował ekspresję obu genów. Co więcej, inhibitory zwierzęcej cytosolowej cyklazy guanylanowej hamowały stymulujące działanie donorów NO [16].

Zawartość cGMP w tkankach roślinnych jest bardzo różna, od 0,1 pmola/g świeżej masy w komórkach aleuronowych jęczmienia aż po 1 μ mol/g świeżej masy w igłach świerku. Poziom endogennego cGMP w badanej kulturze zawieszinowej tytoniu wynosił około 5 pmoli/g świeżej masy, a dla ekstraktu z liści tytoniu około 10 pmoli/g świeżej masy. Infiltracja NOS do liści i traktowanie zawiesiny komórkowej donorem NO powodowały 10–15-krotny wzrost poziomu cGMP w obu systemach doświadczalnych. Wzrost ten był szybki i krótkotrwały [16].

W komórkach zwierzęcych cGMP, powstający w wyniku stymulacji ze strony NO, może wpływać na indukcję syntezy cyklicznej ADP – rybozy (ang. *cyclic ADP-Ribose*, cADPR). Ta cząstka sygnałowa przyłącza się do wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych i aktywuje uwalnianie wapnia. Durner i wsp. [16] wykazali, że cADPR indukuje ekspresję PAL i PR-1 w liściach tytoniu. Efekt ten był blokowany przez czerwień rutenową, która hamuje uwalnianie jonów wapnia z organeli komórek zwierzęcych. Ponadto wykazano synergizm działania cGMP i cADPR w indukcji PAL i PR-1. Czerwień rutenowa znosiła to działanie. Durner i wsp. [16] nie ustalili jednak, czy stymulację ekspresji PR-1 i PAL ze strony cADPR wywołuje NO. Klessig i wsp. [32], wykorzystując również tytoń, stwierdzili stymulujący wpływ NO na ekspresję PR-1 indukowaną właśnie przez cADPR i cGMP. Iniekcja do liści tytoniu zrekombinowanej NOS (źródło podwyższonego poziomu NO) oraz antagonisty cADPR powodowała obniżenie poziomu ekspresji PR-1. Ponieważ nie stwierdzono całkowitej blokady ekspresji PR-1, można zakładać istnienie jeszcze innego szlaku stymulacji ekspresji PR-1 [32].

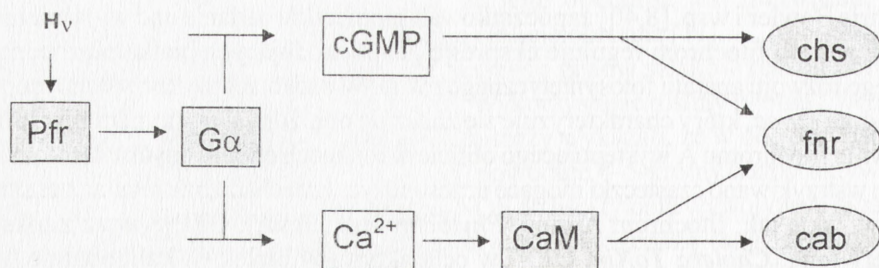
3.2. cGMP jako wtórny przekaźnik w szlaku fitochromowym roślin

Pomimo że fitochromy są najlepiej poznanyymi dotychczas fotoreceptorami roślinnymi, to wciąż niewiele wiadomo o elementach szlaku sygnałowego pomiędzy fitochromem a efektorami.

Chris Bowler i wsp. [8,40] zapoczątkowali pionierskie badania nad wyjaśnieniem, w jaki sposób fitochrom reguluje ekspresję genów kodujących białka niezbędne do pełnego rozwoju aparatu fotosyntetycznego roślin. W badaniach wykorzystano mutant pomidora *aurea*, który charakteryzuje się znacznie obniżonym poziomem fitochromu (głównie fitochromu A występującego obficie w roślinach etiolowanych). Do komórek roślin wstrzykiwano cząsteczki mogące uczestniczyć w mechanizmie regulacji ekspresji genów, takie jak: fitochrom A (ang. *Phytochrom A*, PhyA), GTPγS wraz z toksyną cholery (ang. *Cholera ToXin*, CTX) w celu aktywacji białek G, kalmodulinę (ang. *Multifunctional Calmodulin*, CaM) wraz z jonami wapnia i 8-Br-cGMP. Na wstępie wykazano aktywację białek G w szlaku fitochromowym, który doprowadza do rozwoju chloroplastów i biosyntezy fotoprotektantów [40]. Autorzy powyższych badań wykazali istnienie trzech odrębnych szlaków stymulowanych przez cGMP i jony wapnia (ryc. 3). Sam cGMP wystarcza do indukcji ekspresji genu CHS niezbędnej do biosyntezy antocyjanów, natomiast jony wapnia wraz z kalmoduliną stymulują ekspresję innych genów (np. genów białka wiążącego chlorofil a i b; ang. *Chlorophyll a,b binding protein genes*, CAB) potrzebnych dla częściowego rozwoju chloroplastów, to znaczy chloroplastów pozbawionych dwóch kompleksów fotosyntetycznych: fotosystemu I (PSI) oraz cytochromu b_6f (Cyt. b_6f). Trzeci szlak zależny od cGMP i jonów wapnia prowadzi do produkcji obu tych kompleksów i przypuszczalnie funkcjonalnych chloroplastów (genem modelowym tego szlaku był gen oksydoreduktazy ferrodoksyna $-NADP^+$; ang. *Ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase*, FNR) [8,40].

Analogicznie funkcjonujące szlaki odnaleziono w komórkach soi (*Glycine max*) linii SB-P [9]. Genem modelowym szlaku cGMP-zależnego był tu również gen syntazy chalkonowej. W komórkach poddanych naświetlaniu maksymalną transkrypcję CHS obserwowano po około trzech godzinach. Później jej poziom spadał aż do zerowego w siódmej godzinie naświetlania. Zjawisko to jest zapewne efektem adaptacji wobec stale działającego czynnika stymulującego. Adaptacja ta polega na samoczynnym wyłączeniu systemu indukującego ekspresję CHS. Zgodnie z przypuszczeniami, w komórkach zaadaptowanych do jednej intensywności światła, po przeniesieniu do światła o wyższej intensywności, obserwowano dwa szczyty ekspresji CHS [9].

Również w komórkach soi jak w pomidorze *aurea* 8-Br-cGMP był czynnikiem wystarczającym do wzbudzenia ekspresji CHS w zastępstwie światła [9]. Poziom transkryptu CHS utrzymywał się przez dłuższy czas, gdyż 8-Br-cGMP nie ulega hydrolizie. Zatem to redukcja poziomu cGMP stymulowana przez światło musi odpowiadać za efekt desensytyzacji. Potwierdza tę hipotezę fakt, że wysoce specyficzny inhibitor fosfodiesteraz cGMP (ang. *Zaprinast*) w komórkach zaadaptowanych do światła, po około 10 godzinach od zaaplikowania, był w stanie wzbudzić ekspresję CHS. Również donor NO – nitroprusydek sodu (ang. *Sodium NitroPrusside*, SNP), podobnie jak 8-Br-cGMP, stymulował ekspresję CHS w komórkach zaadaptowanych zarówno do światła, jak i ciemności [9]. W obu przypadkach podobne były: poziom ekspresji, kinetyka indukcji i czas trwania ekspresji. Przez analogię do układu zwierzęcego można przypuszczać, że i tutaj występuje enzym syntetyzujący cGMP indukowany przez NO oraz że ten enzym nie powstaje *de novo*, ale jest obecny w



RYCINA 3. Schemat przedstawiający znane elementy sygnałowe uczestniczące w fitochromowym szlaku transdukcji sygnału świetlnego u roślin: **Pfr** – aktywna forma fitochromu, **G α** – aktywna podjednostka α heterotrimerycznego białka G, **CaM** – zaktywowana przez jony wapnia kalmodulina, **chs** – gen syntazy chalkonowej, **fnr** – gen oksydoreduktazy ferredoksyna-NADP⁺, **cab** – geny białka wiążącego chlorofil a i b

komórkach zaadaptowanych do ciemności i światła. To światło odpowiedzialne jest za modulowanie jego aktywności. Obok wzrostu ekspresji CHS stymulowanej przez 8-Br-cGMP i SNP występował spadek poziomu mRNA CAB i FNR w komórkach soi.

Wykorzystując inhibitory szlaków cGMP- i Ca-zależnego, wykazano, że wstrzymując ekspresję genu CHS szlaku cGMP-zależnego wpływały one jednocześnie na stymulację ekspresji CAB szlaku Ca-zależnego i FNR szlaku cGMP/Ca-zależnego. Ponadto stwierdzono, że stężenie cGMP, indukujące ekspresję CHS, wstrzymywało ekspresję CAB i FNR, i odwrotnie – stężenie jonów wapnia indukujące CAB i FNR hamowało ekspresję CHS [9]. Tego typu wzajemna regulacja polega więc na negatywnej kontroli jednego szlaku przez czynnik pozytywny dla innego szlaku (*reciprocal control*). Istnienie takiego mechanizmu ma swoje uzasadnienie. Wiadomo przecież, że w siewkach tuż po skiełkowaniu u wielu gatunków akumulacja antocyjanów poprzedza rozwój chloroplastów, co również obserwuje się na poziomie ekspresji mRNA. Najpierw występuje stymulacja szlaku prowadzącego do syntezy fotoprotektantów, a wstrzymywany jest rozwój systemu fotosyntetycznego, gdyż fotosynteza nie może rozpocząć się bez obecności barwników ochronnych. To tłumaczyłoby, dlaczego wysoki poziom cGMP wstrzymuje oba szlaki: Ca- i Ca/cGMP-zależny odpowiadające za syntezę komponentów fotosyntetyzujących. Możliwe, że potem w wyniku desensytyzacji cyklicznej guanylanowej sygnał cGMP ulega osłabieniu, a wzrasta stężenie jonów wapnia (co też może indukować mechanizm obniżania sygnału cGMP). Ten wzrost nie hamuje jednak szlaku Ca/cGMP-zależnego, co pozwala na pełne ukształtowanie systemu fotosyntetyzującego.

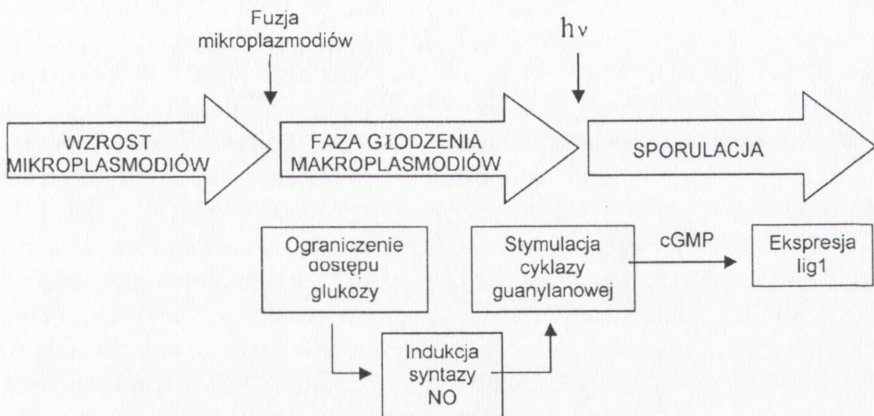
W szlaku fitochromowym Ca/cGMP-zależnym prócz regulacji pozytywnej ekspresji genów funkcjonuje też regulacja negatywna. Podlega jej gen syntazy asparaginowej (ang. *Asparagine Synthase 1*, AS1) [39].

W komórkach zwierzęcych tlenek azotu funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa w przewodnictwie nerwowym, niespecyficznego rodzaju odpowiedzi obronnej organizmu oraz bierze udział w utrzymaniu homeostazy układu krążenia. W wielu reakcjach leżących

u podstaw tych procesów NO moduluje aktywność cytosolowej GC. Udowodniono, że NO uczestniczy w reakcjach obronnych roślin oraz że w szlaku indukowanym przez NO uczestniczy NO-wrażliwa GC. Procesy zależne od światła, takie jak: kiełkowanie nasion, deetiolacja i hamowanie wzrostu hypocotyli i węzłów, były indukowane przez NO w warunkach kompletnej ciemności lub światła niewystarczającego do wzbudzenia tych procesów [6]. Trzeba jednak zaznaczyć, że wobec wielu procesów fizjologicznych podobny wpływ jak światło wywierają również hormony. Właściwości hormonalne wobec procesów wzrostu i rozwoju roślin wykazuje też NO [37]. Zachodzi więc pytanie, czy z fitochromową indukcją genów za pośrednictwem cGMP jest również związany NO.

Taki układ powiązań pomiędzy NO, GC a światłem występuje u śluzowca *Physarum polycephalum* (ryc. 4) [23]. W przypadku ograniczenia dostępu do substancji odżywczych, makroplasmodia różnicują się do sporangiów, a proces ten zależny jest od światła. W warunkach hodowlanych, żeby wprowadzić makroplasmodia w etap sporulacji, głodzono je przez okres pięciu dni w ciemności. W tym okresie poziom mRNA NOS, jak i jej aktywność rosły. Indukcja ekspresji NOS i procesu sporulacji były blokowane przez inhibitor NOS. Sporulacja, która jest indukowana po okresie głodzenia przez impuls świetlny, była wstrzymywana również przez inhibitor NO-zależnej GC. Ponadto ekspresja *lig 1*, genu indukowanego we wczesnym etapie sporulacji, była blokowana przez oba inhibitory. 8-Br-cGMP podawany do pożywki 2 godziny przed zadziałaniem impulsem świetlnym powodował, że makroplasmodia traktowane inhibitorem NOS przechodziły do etapu sporulacji, w czasie którego zachodziła ekspresja *lig 1*.

Molekularna analiza filogenetyczna umiejscowiła śluzowca i inne *Mycetozoa* w królestwie *Eukaryota* między grzybami a roślinami zielonymi [4]. Analiza sekwencji NOS *Physarum* pokazuje, że w znacznym stopniu różnią się one od zwierzęcych.



RYCINA 4. Schemat przemian biochemicznych zachodzących w cyklu rozwojowym *Physarum polycephalum* (wg [23], zmodyfikowane)

Zatem sekwencje NOS *Physarum* mogą być przejściowymi między zwierzęcymi a roślinnymi i mogą być wykorzystane w poszukiwaniu genu NOS funkcjonującej hipotetycznie w szlakach sygnalizacyjnych roślin. Przykład *Physarum* dowodzi, że współdziałanie sygnałów NO i cGMP nie jest charakterystyczne tylko dla komórek zwierzęcych. Może okazać się mechanizmem uniwersalnym, działającym również w komórkach roślinnych.

3.3. cGMP moduluje otwieranie aparatów szparkowych indukowane przez roślinne peptydy natriuretyczne

U kręgowców za regulację gospodarki wodnej odpowiadają między innymi czynniki hormonalne zwane peptydami natriuretycznymi (ang. *Natriuretic Peptides*, NP). Zidentyfikowano je u wielu gatunków kręgowców, poczynając od *Elasmobranchii* (ryb spodoustych) aż po ssaki. Sklasyfikowano dotąd cztery typy ligandów peptydowych: ANP (ang. *Atrial Natriuretic Peptide*), BNP (ang. *Brain Natriuretic Peptide*), VNP (ang. *Ventricular Natriuretic Peptide*) i CNP (ang. *C-type NP*). Trzy pierwsze to hormony sercowe, a CNP to głównie czynnik parakrynowy mózgu i układu obwodowego. Pod względem funkcjonowania najlepiej został scharakteryzowany ANP, który powoduje zniesienie retencji jonów wody i sodu, czego konsekwencją jest obniżenie ciśnienia krwi. Bezpośrednimi receptorami dla peptydów natriuretycznych są błonowe cyklazy guanylanowe typu A i B.

Vesely i Giordano [56] jako pierwsi wskazali na możliwość funkcjonowania peptydów natriuretycznych w komórkach roślinnych. Stosując metody radioimmunologiczne przy wykorzystaniu przeciwciał specyficznych dla ludzkiego ANP i jego prosegmentów, wykazali, że w liściach i łodygach *Dracena godseffiana*, występują ANP, proANP(1-98) i proANP(31-67) [56]. Prosegmenty ANP, ale nie sam ANP, wzmagają tempo transportu wody w układzie naczyniowym roślin [57]. ¹²⁵I-ANP szczurów wiązał się specyficznie *in vitro* i *in situ* do błon wyizolowanych z liści *Tradescantia multiflora* [21,55]. Doniesiono też o obecności peptydu ANP-podobnego w liściach i łodygach gatunku *Metasequoia* [61]. Gehring i wsp. [20,21] dostarczyli dowodów na istnienie biologicznie aktywnego systemu NP u roślin. ANP szczurów indukował otwieranie aparatów szparkowych u *Tradescantia albiflora* w zależności od stężenia. Wpływ ANP na transpirację roślin może odbywać się przez receptory GC, ponieważ efekt ANP był wstrzymywany przez inhibitory GC [20,21]. Efekt analogiczny do ANP wywoływał 8-Br-cGMP u *Tradescantia albiflora*, *Commelina communis* i *Vicia faba* [12,43,45]. Billington i wsp. [7] oczyścili biologicznie aktywne roślinne peptydy natriuretyczne (ang. *immunoreactive Plant Natriuretic Peptides*, irPNP) z bluszczu *Hedera helix* przez immunopowinowactwo do przeciwciała ANP-ludzkiego. IrPNP wywoływały szybki wzrost poziomu cGMP w tkankach korzenia kukurydzy *Zea mays* [44]. Stymulację otwierania aparatów szparkowych i wzrostu stężenia cGMP w protoplastach komórek szparkowych w wyniku zastosowania irPNP, ANP lub kinetyny obserwowano u *Vicia faba*. Inhibitor GC hamował otwieranie aparatów szparkowych indukowane przez irPNP [45]. Udokumentowano również, że

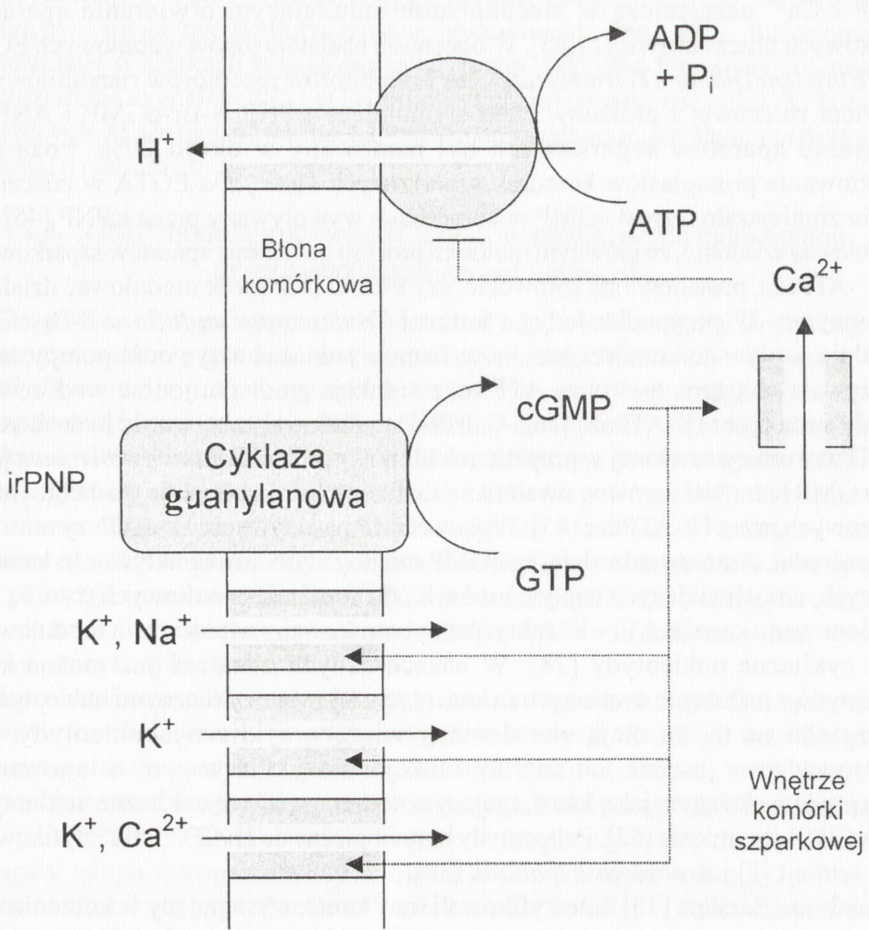
cGMP i Ca^{2+} uczestniczą w mechanizmie indukującym otwieranie aparatów szparkowych przez auksynę [12,45]. W obecności chelatora jonów wapniowych EGTA (ang. *Ethy-leneDiamineTetraAcetate*), jak i inhibitorów receptorów rianodinowych: czerwieni rutenowej i prokainy, efekt stymulujący irPNP, 8-Br-cGMP i ANP na otwieranie aparatów szparkowych był hamowany w około 20%. Poza tym potraktowanie protoplastów komórek szparkowych *Vicia faba* EGTA w znacznym stopniu zmniejszało wzrost cGMP w komórkach wywoływany przez irPNP [45].

Ponieważ wiadomo, że głównym motorem procesu otwierania aparatów szparkowych jest H^+ -ATPaza, postanowiono sprawdzić, czy 8-Br-cGMP może modulować działanie tego enzymu. W przypadku łądyg i korzeni *Tradescantia multiflora* 8-Br-cGMP stymuluje napływ do komórek kationów, hamuje jednakże aktywność pompy, na co wskazywała obniżona hydroliza ATP oraz redukcja gradientu jonów wodorowych wywoływana przez H^+ -ATPazę [46,54]. IrPNP stymulowały aktywność hydrolityczną H^+ -ATPazy umiejscowionej w preparatach błonowych liści *Solanum tuberosum* [45]. 8-Br-cGMP hamował zarówno uwalnianie fosforanu, jak i tworzenie gradientu jonów wodorowych przez H^+ -ATPazę [45]. Wpływ cGMP na aktywność H^+ -ATPazy musi być więc pośredni. Autorzy zakładają, że cGMP mógłby stymulować aktywność kanałów jonowych, umożliwiających napływ jonów K^+ do komórek szparkowych (ryc. 5).

Sklonowano kanał KAT1 - K^+ rektyfikator bramkowany napięciem, a modulowany przez cykliczne nukleotydy [28]. W bazach danych odnaleźć już można kilka polipeptydów roślinnych uważanych za kanały stymulowane cyklicznymi nukleotydami ze względu na to, że mają one domeny wiążące cykliczne nukleotydy. Nie przeprowadzono jeszcze ich analizy funkcjonalnej. Pierwszym sklonowanym polipeptydem służącym jako kanał, mającym domenę wiążącą cykliczne nukleotydy, był HvCBT1 jęczmienia [52]. Polipeptydy homologiczne do HvCBT1 zidentyfikowano też w tytoniu [1] i *Arabidopsis thaliana* [35].

Maathius i Sanders [38] zidentyfikowali inny kanał, występujący w korzeniach *A. thaliana*, niezależny od napięcia błonowego (ang. *Voltage Independent Channel*, VIC), który umożliwiał napływ Na^+ do komórek i był wrażliwy na obecność cyklicznych nukleotydów. Nawet zastosowanie mikromolarnych ilości cGMP lub cAMP powodowało szybkie zamykanie kanałów. Badania elektrofizjologiczne dowiodły, że cykliczne nukleotydy redukowały przepływ Na^+ przez kanał. Ponadto dodanie analogów cyklicznych nukleotydów do medium, na którym rosły rośliny rzodkiewnika, zwiększało tolerancję tych roślin na zasolenie, wynikającą z obniżonej w nich akumulacji Na^+ [38].

Skoro cGMP, jak i jony wapnia hamują aktywność H^+ -ATPazy [3], możliwe jest, że mogą one współdziałać w jednym szlaku sygnalizacyjnym i modulować stan aparatu szparkowego. Tak jak jest to w komórkach zwierzęcych, cGMP mógłby indukować syntezę cADPR z dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *Nicotinic acid Adenine Dinucleotide*, NAD^+), który z kolei aktywowałby receptory rianodinowe i uwalnianie jonów wapniowych do cytosolu, a te wpływałyby na aktywność H^+ -ATPazy. Ponieważ EGTA, obniżający poziom Ca^{2+} dostępnych zewnątrzkomórkowo, wykazywał wpływ negatywny na proces otwierania aparatów stymulowany przez 8-Br-cGMP, dlatego autorzy zaproponowali, że cGMP mógłby też stymulować napływ tych kationów z



RYCINA 5. Model działania irPNP i cGMP w modulacji H⁺-ATPazy i kanałów jonowych w reakcji stymulacji otwierania aparatów szparkowej (wg [45], zmodyfikowane)

zewnątrz (ryc. 5). Sklonowano nieselektywny kanał kationowy bramkowany cAMP i cGMP. W układach heterologicznych (mutancie *S. cerevisiae*, oocytach *X. laevis* i komórkach linii HEK293) polipeptyd AtCNGC2 funkcjonował jako kanał dla K⁺, jak i Ca²⁺, ale tylko w obecności dostępnych wewnątrzkomórkowo cAMP lub cGMP [36].

4. PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że cząsteczka cGMP jest obecna również w komórkach roślinnych. Choć nie zidentyfikowano w nich układu generującego cGMP, to przedstawiono dowody pośrednie wskazujące na to, że taki istnieje. Należy do nich udokumentowany wzrost poziomu cGMP w odpowiedzi na stymulację zwierzęcą NOS, donorami NO lub też roślinnymi peptydami natriuretycznymi. Poza tym stwierdzono również efektywne działanie inhibitorów zwierzęcych cyklaz guanylanowych w hamowaniu wzrostu stężenia cGMP w komórkach roślinnych.

Przeprowadzone badania wskazują na funkcjonowanie sygnału cGMP w odpowiedzi obronnej na patogeny, w szlaku fitochromowym oraz w regulacji otwierania i zamykania aparatów szparkowych. W dwóch pierwszych działaniach cGMP doprowadza poprzez nieznaną dotąd czynnik do indukcji ekspresji odpowiednich genów. W procesie wymienionym jako trzeci rola cGMP polega prawdopodobnie na aktywacji kanałów jonowych.

Przez analogię do poznanych cyklaz zwierzęcych, generowanie sygnału cGMP w szlaku NO-zależnym wskazuje na istnienie w komórkach roślinnych rozpuszczalnej cyklazy, która jest indukowana przez NO. Natomiast udział roślinnych peptydów natriuretycznych w reakcji prowadzącej do wzrostu poziomu cGMP w komórkach szparkowych nasuwa przypuszczenie o funkcjonowaniu w nich błonowej cyklazy guanylanowej. Zatem ważną kwestią do rozwiązania pozostaje wciąż, czy faktycznie w komórkach roślinnych funkcjonują takie enzymy, czy też zupełnie odmienny od zwierzęcego układ tworzący sygnał cGMP.

5. LITERATURA

- [1] ARAZI T, SUNKAR R, KAPLAN B, FROMM H. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J* 1999; **20**: 171–182.
- [2] ASHAMAN DF, LIPTON R, MELICOW MM, PRICE TD. Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1963; **11**: 330–334.
- [3] ASSMANN SM, SHIMAZAKI K. The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol* 1999; **119**: 809–815.
- [4] BALDAUF SL, DOOLITTLE WF. Origin and evolution of the slime molds (*Mycetozoa*). *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**: 12007–12012.
- [5] BAUDE EJ, ARORA VK, YU S, GARBERS DL, WEDEL BJ. The cloning of a *Caenorhabditis elegans* guanylyl cyclase and the construction of a ligand-sensitive mammalian/nematode chimeric receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 16035–16039.
- [6] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 2000; **210**: 215–221.
- [7] BILLINGTON T, PHARMAWATI M, GEHRING CA. Isolation and immunoaffinity purification of biologically active plant natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **235**: 722–725.

- [8] BOWLER C, NEUHAUS H, YAMAGATA H, CHUA NH. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 1994; **77**: 73–81.
- [9] BOWLER C, YAMAGATA H, NEUHAUS G, CHUA N-H. Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev* 1994; **8**: 2188–2202.
- [10] BROWN EG, NEWTON RP. Analytical procedures for cyclic nucleotides and their associated enzymes in plant tissues. *Phytochem Anal* 1992; **3**: 1–13.
- [11] CLARKE A, DESIKAN R, HURST RD, HANCOCK JT, NEILL SJ. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 2000; **24**(5): 667–677.
- [12] COUSSON A, VAVASSEUR A. Putative involvement of cytosolic Ca²⁺ and GTP-binding proteins in cyclic-GMP-mediated induction of stomatal opening by auxin in *Commelina communis* L. *Planta* 1998; **206**: 308–314.
- [13] DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998; **394**: 585–588.
- [14] DIZHOR AM, LOWE DG, OLSHEVSKAYA EV, LAURA RP, HURLEY JB. The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, Ret GC, is present in outer segment and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* 1994; **12**: 1345–1352.
- [15] DUDA T, GORĄCZNIK RM, SHARMA RK. Site-directed mutational analysis of a membrane guanylate cyclase cDNA reveals the atrial natriuretic factor signaling site. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 7882–7886.
- [16] DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG DE. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10328–10333.
- [17] FRINS S, BÜNIGK W, MÜLLER F, KELLNER R, KOCH KW. Functional characterisation of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8022–8027.
- [18] FÜLLE HJ, VASSAR R, FOSTER DC, YANG RB, AXEL R, GARBERS DL. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3571–3575.
- [19] GARBERS DL, LOWE DG. Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30741–30744.
- [20] GEHRING CA. Natriuretic peptides – a new class of plant hormone? *Ann Botany* 1999; **83**: 329–334.
- [21] GEHRING CA, KHALID K, TOOP T, DONALD JA. Rat natriuretic peptide binds specifically to plant membranes and induces stomatal opening. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **228**: 739–744.
- [22] GOLDBERG ND, DIETZ SB, O'TOOLE AG. Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem* 1969; **244**: 4458–4466.
- [23] GOLDERER G, WERNER ER, LEITNER S, GRÖBNER P, WERNER-FELMAYER G. Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. *Genes Dev* 2001; **15**: 1299–1309.
- [24] GORĄCZNIK RM, DUDA T, SITARAMAYYA A, SHARMA RK. Structural and functional characterisation of the rod outer segment membrane guanylate cyclase. *Biochem J* 1994; **302**: 455–461.
- [25] GORĄCZNIK RM, DUDA T, SHARMA RK. Structural and functional characterisation of a second subfamily member of the calcium-modulated bovine rod outer segment membrane guanylate cyclase, ROS-GC2. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234**: 666–670.
- [26] GORCZYCA WA, GREY-KELLER MP, DETWILER PB, PALCZEWSKI K. Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4014–4018.
- [27] HARDMAN JG, SUTHERLAND EW. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 1969; **244**: 6363–6370.
- [28] HOSHI T. Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *J Gen Physiol* 1995; **105**: 309–328.
- [29] ISHIKAWA E, ISHIKAWA S, DAVIS JW, SUTHERLAND EW. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J Biol Chem* 1969; **244**: 6371–6376.
- [30] JÓZEFOWSKI SZ. Signal detection and transduction involved in plant disease resistance. I. Recognition and early signal transduction pathways. *Post Biol Kom* 2000; **27**(4): 609–621.
- [31] JÓZEFOWSKI SZ. Signal detection and transduction involved in plant disease resistance. II. Defense gene activation. *Post Biol Kom* 2000; **27**(4): 623–631.
- [32] KLESSIG DF, DURNER J, NOADR, NAVARRE DA, WENDEHENNE D, KUMAR D, ZHOU JM, SHAH J, ZHANG S, KACHROO P, TRIFA Y, PONTIER D, LAM E, SILVA H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8849–8855.

- [33] KLUMPP S, KLEEFELD G, SCHULTZ JE. Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclase of the excitable ciliary membrane from *Paramecium*. Dissociation of calmodulin by La^{3+} : calmodulin specificity and properties of the reconstituted guanylate cyclase. *J Biol Chem* 1983; **258**: 12455–12459.
- [34] KOESLING D. Modulators of soluble guanylyl cyclase. *Arch Pharmacol* 1998; **358**: 123–126.
- [35] KOHLER C, MERKLE T, NEUHAUS G. Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1999; **18**: 97–104.
- [36] LENG Q, MERCIER RW, YAO W, BERKOWITZ GA. Cloning and first functional characterisation of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* 1999; **121**: 753–761.
- [37] LESHEM YY, HARAMATY E. Plant aging: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage. *J Plant Physiol* 1996; **148**: 258–263.
- [38] MAATHIUS FJM, SANDERS D. Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol* 2001; **127**: 1617–1625.
- [39] NEUHAUS G, BOWLER C, HIRATSUKA K, YAMAGATA H, CHUA N-H. Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J* 1997; **16**: 2554–2564.
- [40] NEUHAUS G, BOWLER C, KERN R, CHUA NH. Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 1993; **73**: 937–952.
- [41] PENSON SP. cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 1996; **8**: 2325–2333.
- [42] PFEIFFER S, JANISTYN B, JASSNER G, PICHORNER H, EBERMANN R. Gaseous nitric oxide stimulates guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) formation in spruce needles. *Phytochemistry* 1994; **36**: 259–262.
- [43] PHARMAWATI M, BILLINGTON T, GEHRING CA. Stomatal guard cell responses to kinetin and natriuretic peptides are cGMP dependent. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 272–276.
- [44] PHARMAWATI M, GEHRING CA, IRVING HR. An immunofluorescence purified plant natriuretic peptide analogue modulates cGMP level in the *Zea mays* root stele. *Plant Sci* 1998; **137**: 107–115.
- [45] PHARMAWATI M, MARYANI MM, NIKOLAKOPOULOS T, GEHRING CA, IRVING HR. Cyclic GMP modulates stomatal opening induced by natriuretic peptides and immunoreactive analogues. *Plant Physiol Biochem* 2001; **39**: 385–394.
- [46] PHARMAWATI M, SHABALA SN, NEWMAN IA, GEHRING CA. Natriuretic peptides and cGMP modulate K^+ , Na^+ and H^+ fluxes in *Zea mays* roots. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; **2**: 53–57.
- [47] SCHMIDT HHHW, LOHMANN SM, WALTER U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta* 1993; **1178**: 153–175.
- [48] SCHULTZ JE, POHL T, KLUMPP S. Voltage-gated Ca^{2+} entry into *Paramecium* linked to intraciliary increase in cyclic GMP. *Nature* 1986; **322**: 271–273.
- [49] SCHULTZ G, BÖHME E, MUNSKE K. Determination of enzyme activity. *Life Sci* 1969; **8**: 1323–1332.
- [50] SCHULZ S, SINGH S, BELLET RE, SINGH G, TUBB DJ, CHIN H, GARBERS DL. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 1989; **58**: 1155–1162.
- [51] SCHULZ S, WEDEL BJ, MATTHEWS A, GARBERS DL. The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 1032–1037.
- [52] SCHUURINK RC, SHARTZER SF, FATH A, JONES RL. Characterisation of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1944–1949.
- [53] SHAH S, HYDE DR. Two *Drosophila* genes that encode the alpha and beta subunits of the brain soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 15368–15376.
- [54] SUWASTIKA IN, GEHRING CA. The plasma-membrane H^+ -ATPase from *Tradescantia* stem and leaf tissue is modulated *in vitro* by cGMP. *Arch Biochem Biophys* 1999; **367**: 137–139.
- [55] SUWASTIKA IN, TOOP T, IRVING HR, GEHRING CA. *In situ* and *in vitro* binding of natriuretic peptide hormones in *Tradescantia multiflora*. *Plant Biol* 2000; **2**: 1–3.
- [56] VESELEY DL, GIORDANO AT. Atrial natriuretic hormonal system in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 695–700.
- [57] VESELEY DL, GOWER JR WR, GIORDANO AT. Atrial natriuretic peptides are present throughout the plant kingdom and enhance solute flow in plants. *Am J Physiol* 1993; **265**: E465–E477.

- [58] WALDMAN S.A., BARBER M, PEARLMAN J, PARK J, GEORGE R, PARKINSON SJ. Heterogeneity of guanylyl cyclase C expressed by human colorectal cancer cell lines *in vitro*. *Cancer Epid Biomarkers Prev* 1998; **7**: 505–514.
- [59] WHITE AA, AURBACH GD. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1969; **191**: 686–697.
- [60] YANG RB, FOSTER DC, GARBERS DL, FÜLLE HJ. Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 602–606.
- [61] YANG Q, GOWER JR WR, LI C, CHEN P, VESELY DL. Atrial natriuretic-like peptide and its prohormone within *Metasequoia*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; **221**: 188–192.
- [62] ZABEL U, WEEGER M, LA M, SCHMIDT HHHW. Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J* 1998; **335**: 51–57.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 09.06.2002 r.

Przyjęto: 01.07.2002 r.

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM

Zakład Biologii Molekularnej Roślin

ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

e-mail: mok@amu.edu.pl

**ROLA KOMÓREK GWIAŹDZISTYCH
W REGULACJI FUNKCJI WĄTROBY.
I. MORFOLOGIA I WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK
GWIAŹDZISTYCH *IN SITU* ORAZ W HODOWLI
KOMÓRKOWEJ**

THE ROLE OF HEPATIC STELLATE CELLS
IN THE REGULATION OF LIVER FUNCTIONS.
I. MORPHOLOGY AND CHARACTERISTICS
OF INTACT AND CULTURED CELLS

Zbigniew KMIEĆ

Katedra Histologii i Immunologii, Zakład Histologii, Akademia Medyczna
w Gdańsku

Streszczenie. Komórki gwiaździste wątroby (synonimy: lipocyty, komórki perisinusoidalne wątroby, komórki gromadzące lipidy, komórki Ito) znajdują się w przestrzeni okołozatokowej (Dissego), a ich podstawową cechą morfologiczną stanowi obecność licznych wakuoli lipidowych (zajmujących ok. 20% objętości komórki) oraz długich wypustek oplatających często ścianę zatoki wątrobowej. W normalnych warunkach komórki gwiaździste zawierają 70–80% zasobów witaminy A w organizmie odgrywając kluczową rolę w metabolizmie tego związku. Komórki gwiaździste produkują większość składników macierzy pozakomórkowej płacika wątrobowego, a także enzymy uczestniczące w ich degradacji. Dzięki obecności α -aktyny typowej dla gładkich miocytów oraz obecności receptorów dla wielu substancji wazoaktywnych komórki gwiaździste mogą się kurczyć i modulować przepływ krwi w zatokach wątrobowych. W warunkach hodowli komórki gwiaździste ulegają spontanicznej przemianie określanej mianem aktywacji, w wyniku której dochodzi do utraty wakuoli lipidowych, proliferacji i migracji tych komórek oraz wydzielania różnych składników substancji pozakomórkowej i wielu innych związków, m.in. cytokin, czynników wzrostu i substancji naczynioaktywnych. Uszkodzenie hepatocytów prowadzi do transformacji komórek gwiaździstych w aktywne metabolicznie komórki o fenotypie miofibroblastów, które odgrywają główną rolę w rozwoju włóknienia wątroby.

Słowa kluczowe: komórki gwiaździste wątroby: morfologia, funkcja, aktywacja.

Summary: Hepatic stellate cells (synonyms: vitamin A-storing cells, lipocytes, Ito cells, fat-storing cells, liver-specific pericytes, perisinusoidal cells) are localized in the perisinusoidal space of Disse. They are characterized by the abundance of intracytoplasmic fat droplets (up to 20% of the cell volume), and the presence of well-branched cytoplasmic processes, that embrace endothelial cells and provide focally a double lining for sinusoid. In the normal liver stellate cells store 70–80% of body's vitamin A and control synthesis and turnover of main extracellular matrix components. Due to the presence of smooth muscle α -actin, synthesis of vasoactive compounds, and sensitivity to vasoactive agents, stellate cells regulate contractility of sinusoids, and thus sinusoidal blood flow. Cultured HSC spontaneously transform into metabolically active myofibroblast-like cells that lose lipid droplets, proliferate, migrate and produce enhanced amounts of extracellular matrix components, cytokines, growth factors and many other substances. Hepatocyte damage leads to the activation of quiescent stellate cells that acquire myofibroblast-like phenotype and play a key role in the development of fibrotic response in the liver.

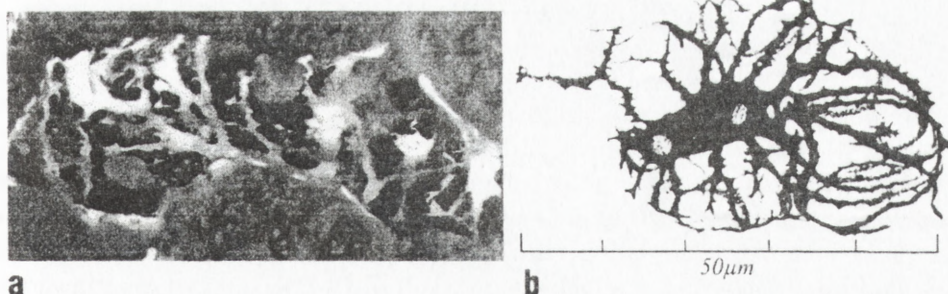
Key words: hepatic stellate cells: morphology, functions, activation.

Skróty: BMP – białko morfogenetyczne kości; CTSCF – czynnik komórek macierzystych (pnia) tkanki łącznej; CINC – chemotraktant neutrofilii indukowany przez cytokiny; M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów; MIP – białko zapalne makrofagów; MMP – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej, PPAR – receptor aktywowany przez związki wywołujące proliferację peroksydomów; RBP – białko wiążące retinol; VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń.

Przed 125 laty Karol Kupffer opisał występowanie w wątrobie szczura komórek o gwiaździstym kształcie, które położone były wokół zatokowych naczyń włosowatych pomiędzy komórkami śródbłonna a hepatocytami (cyt. wg [67]). Chociaż początkowo Kupffer zaliczył te komórki do grupy okołonaczyniowych komórek tkanki łącznej, po 20 latach zmienił zdanie sugerując, że należą one do specjalnego typu komórek śródbłonna o właściwościach fagocytarnych. Dopiero w ciągu ostatnich dziesięcioleci wykazano, że opisane przez Kupffera komórki okołozatokowe (perisinusoidalne) mają zupełnie inne cechy niż makrofagi zatok wątrobowych, czyli komórki Browicza-Kupffera. Komórki perisinusoidalne określano różnymi nazwami (komórki Ito, komórki gromadzące lipidy, lipocyty, pericyty wątrobowe, komórki perisinusoidalne wątroby), jednak ostatnio powszechnie stosowany jest termin gwiaździste komórki wątrobowe (GKW), który używany będzie również w niniejszej pracy.

1. MORFOLOGIA KOMÓREK GWIAZDZISTYCH *IN SITU*

Komórki gwiaździste znajdują się w przestrzeni okołozatokowej (Dissego), tuż pod komórkami śródbłonna zatok, a ciała tych komórek często leżą w bocznych zachyłkach pomiędzy sąsiadującymi hepatocytami. W przeciwieństwie do typowych pericytów GKW nie są otoczone błoną podstawną. Komórki gwiaździste cechuje obecność dwóch rodzajów wypustek cytoplazmatycznych: dłuższych, które docierają poprzez blaszki utworzone z hepatocytów do sąsiednich zatok wątrobowych, oraz krótszych, które okrążają „własny” sinusoid wzmacniając w ten sposób jego ścianę (ryc. 1A). Poprzez swoje wypustki pojedyncza komórka gwiaździsta może w ten sposób docierać do więcej niż jednej sąsiadującej zatoki wątrobowej i kontaktować się z dużą liczbą hepatocytów [67].



RYCINA 1. Gwiazdzista komórka wątroby: a – obraz preparatu wątroby świni wybarwionego metodą Golgiego w skeningowym mikroskopie elektronowym (technika *back-scatter*), b – przestrzenna lokalizacja wypustek w stosunku do ściany zatoki wątrobowej; zdjęcie i rysunek udostępnione przez prof. Kenjiro Wake (Tokio)

Najbardziej charakterystyczną cechą strukturalną GKW jest obecność w ich cytoplazmie dużych (o średnicy do 8 μm) kropli lub wakuoli tłuszczu, które zawierają pochodne witaminy A (retinoidy, głównie palmitynian retinyli), trójglicerydy, cholesterol i wolne kwasy tłuszczowe [66]. W prawidłowej wątrobie ludzkiej wakuole lipidowe stanowią ok. 20,5% całkowitej objętości komórki gwiazdzistej [66]. Autofluorescencja witaminy A zawartej w komórkach gwiazdzistych umożliwia ich zlokalizowanie *in vivo* przy pomocy mikroskopu z oświetleniem epifluorescencyjnym [72]. Cytoplazma komórek gwiazdzistych zawiera ponadto dobrze rozbudowany aparat Golgiego i szorstką siateczkę śródplazmatyczną, słabo rozwiniętą siateczkę gładką, małą liczbę mitochondriów i lizosomów oraz wyraźną centriolę. W cytoplazmie podstawowej obecne są liczne pęczki mikrofilamentów, mikrotubul oraz filamentów pośrednich. Za specyficzne markery komórek gwiazdzistych uznaje się obecność filamentów α -aktyny typu komórek mięśniowych gładkich, takich filamentów pośrednich, jak: desmina, nestyna i wimentyna, oraz białek charakterystycznych dla komórek pochodzenia neuroektodermalnego, takich jak: GFAP, NGF, synaptofizyna i RhoN [33].

In vivo gwiazdziste komórki mogą występować w postaci dwóch odmian fenotypowych: w prawidłowej wątrobie obecne są w postaci spoczynkowej, opisanej powyżej, natomiast w przewlekłych chorobach wątroby, a szczególnie w przebiegu jej zwłóknienia, przybierają postać tzw. aktywnych komórek gwiazdzistych o fenotypie właściwym miofibroblastom tkanki łącznej. Aktywne GKW charakteryzuje brak wakuoli lipidowych, zwiększona proliferacja oraz podwyższona synteza wielu składników substancji pozakomórkowej [21,27]. Czynniki prowadzące do aktywacji komórek gwiazdzistych i utrwalające ich fenotyp miofibroblastyczny odgrywają ważną rolę w procesie włóknienia i marskości wątroby.

2. FUNKCJE KOMÓREK GWIAZDZISTYCH W WARUNKACH PRAWIDŁOWYCH

Komórki gwiaździste można izolować z wątroby szczura i innych gryzoni, a także z wątroby ludzkiej przez trawienie perfundowanego narządu kolagenazą, enzymem, który osłabia desmosomalne połączenia międzykomórkowe, i pronazą, enzymem niszczącym hepatocyty. Uzyskiwana zawiesina komórkowa rozdzielana jest następnie na frakcje komórkowe w wyniku wirowania w gradientach gęstości takich związków, jak: metrizamid, Nycodenz, straktan lub Percoll. Ze względu na wysoką zawartość lipidów i wynikającą z tego niską gęstość, komórki gwiaździste można oddzielić od innych niemiąższowych komórek wątroby, tj. od komórek Browicza-Kupffera, komórek śródbłonka i swoistych dla wątroby komórek NK (*pit cells*) [33].

W warunkach hodowli *in vitro* komórki gwiaździste podlegają spontanicznej przemianie, określanej mianem transformacji lub aktywacji, od fenotypu spoczynkowego do fenotypu aktywnego. W trakcie hodowania na podłożu plastikowym komórki stopniowo rozplaszczają się, wykazują zdolność migracji (nasiloną w obecności PDGF i komórek Kupffera) i rozpoczynają intensywną syntezę szeregu składników substancji pozakomórkowej [27]. Uważa się, że w hodowlach trwających nie dłużej niż trzy dni, komórki gwiaździste wykazują jeszcze fenotyp spoczynkowy. Takim nieaktywnym GKW przypisuje się następujące funkcje.

- 1) **Metabolizm retinoidów** – Ponad 85% zasobów witaminy A w organizmie zgromadzone jest w wątrobie, z czego 80–90% magazynowane jest w lipidowych wakuolach komórek gwiaździstych. GKW regulują metabolizm retinoidów w organizmie dzięki wysokiej aktywności odpowiednich enzymów (acylotransferaza: lecytyna-retinol, hydrolaza estrów retinyłu) i dużej zawartości białek wiążących retinoidy (komórkowe białka wiążące retinol: CRBP-I i CRBP-II oraz białko wiążące retinol: RBP) [66].
- 2) **Modulowanie przepływu krwi w sinusoidach** – Zdolność kurczenia się GKW zaobserwowano zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [52,62]. Ta właściwość komórek gwiaździstych umożliwia im udział w kontrolowaniu przepływu krwi w sinusoidach dzięki obecności w błonie komórkowej receptorów dla licznych substancji wazoaktywnych (tab. 1). Szczególną rolę w regulacji perfuzji w zatokach wątroby odgrywa endotelina-1, która jest syntetyzowana także przez komórki gwiaździste [52], podobnie jak inne związki naczynioaktywne (tab. 2).
- 3) **Synteza składników macierzy pozakomórkowej** – W warunkach fizjologicznych komórki gwiaździste stanowią główne źródło makrocząsteczek substancji pozakomórkowej i enzymów kontrolujących ich degradację (tab. 2). Oddziaływania między komórkami gwiaździstymi, innymi rodzajami komórek wątrobowych oraz składnikami macierzy pozakomórkowej odgrywają podstawową rolę w procesie włóknienia wątroby, zostały one przedstawione w następnym artykule.

TABELA 1. Receptory gwiaździstych komórek wątroby

Rodzaj receptorów	Piśmien- nictwo
1. Receptory dla składników macierzy pozakomórkowej	
Integryny ^a (a1b1, a2b1, avb1, a6b4)	[10,46]
2. Receptory dla cytokin i czynników wzrostu	
zasadowy FGF	[27]
Interferon gamma (IFN- γ)	[27]
IGF-I	[56]
IGF-II/mannoza-6-fosforan	[27]
NGF, receptor p75	[12,65]
PDGF- α oraz - β	[27]
TGF- β (receptory typu II, III, oraz typu I dla TGF- β /aktywiny)	[8,13,14]
TNF- α , receptory typu I oraz II	[35]
Aktywator plasminogenu (u-PA)	[20]
VEGF (naczyniopochodny czynnik wzrostu)	[1]
3. Receptory substancji wazoaktywnych	
Angiotensyna II	[71]
ANP (przedsionkowy peptyd natriuretyczny)	[26]
Endotelina-1, receptor typu A oraz B	[52]
Arginino-wazopresyna, receptor typu V ₁	[4]
Prostaglandyny	[19]
Tromboksan	[19]
Trombina	[40]
Receptory purynergiczne	[63]
Receptory α_1 -adrenergiczne	[50]
4. Receptory dla innych ligandów	
Anafilatoksyna C5a	[57]
CD40	[57]
Fas (CD95)	[54]
Ferrytyna	[48]
Glikokortykoidy	[47]
PPAR- β	[28]
PPAR- γ	[23]
Kwas retinowy (RAR- α , - β , - γ oraz RXR- α , - β)	[21]
Somatostatyna	[51]
Zaawansowane końcowe produkty glikacji (RAGE)	[18]

^a receptory dla kolagenu typu I i IV, fibronektyny i lamininy, ^b stosunkowo niski poziom ekspresji w porównaniu do makrofagów wątroby.

4) Synteza czynników wzrostu i cytokin – W warunkach fizjologicznych zarówno hepatocyty, jak i komórki gwiaździste produkują insulinopodobny czynnik wzrostu, IGF-1 oraz białka wiążące IGF (tab. 2), przy czym synteza poszczególnych rodzajów białek wiążących IGF zachodzi w różnych rodzajach komórek wątrobowych [24]. Z kolei synteza czynnika wzrostu hepatocytów, HGF zachodzi głównie w komórkach gwiaździstych, a stymulacja syntezy HGF przez wydzielany przez hepatocyty IGF-1 stanowi przykład współdziałania mięszszowych i niemięszszowych komórek wątroby [59]. Natomiast synteza TGF- β , oraz białek wiążących tę cytokinę zachodzi w prawidłowych warunkach wyłącznie w komórkach Browicza-Kupffera i w komórkach gwiaździstych wątroby. W wyniku uszkodzenia hepatocytów aktywowane komórki gwiaździste stają się głównym miejscem syntezy TGF- β , cytokiny o silnym działaniu fibrogennym [7]. GKW wydzielają też szereg innych cytokin, które wywierają głównie efekty wewnątrzwątrobowe (tab. 2).

5) Synteza erytropoetyny – Obecność erytropoetyny wykazano w wątrobie zarówno

TABELA 2. Substancje syntetyzowane i wydzielane przez komórki gwiaździste wątroby

1. Składniki macierzy pozakomórkowej oraz enzymy i związki związane z jej degradacją	
Białka	
Kolagen typu I, III-VI oraz XVIII	[27,42]
Entaktyna (nidogen)	[27]
Fibronektyna	[27]
Laminina	[27]
Tenascyna	[27]
Undulina	[27]
Glikozaminoglikany i proteoglikany	
Biglikan	[27]
Dekoryna	[27]
Siarczany chondroityny, heparanu i dermatanu	[27]
Kwas hialuronowy	[27]
Syndekan	[27]
Enzymy degradujące składniki substancji pozakomórkowej	
Kolagenaza interstycjalna (MMP-1 u ludzi, MMP-13 u szczura)	[2]
Kolagenaza/gelatynaza A (MMP-2)	[2]
Stromelizyna-1 (MMP-3), i-2	[37]
Progelatynaza A (MMP-14)	[6]
Białko aktywujące fibroblasty (FAP)	[38]
Tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP)	
TIMP-1	[2]
TIMP-2	[30]
Główne składniki układu aktywującego plazminogen:	
Aktywator plazminogenu typu urokinazy (u-PA)	[20]
Inhibitor aktywatora plazminogenu typ I (PAI-1)	[20]

w hepatocytach, jak i w komórkach gwiaździstych [15]. GKW wykazują aktywność 5'-egzonukleotydyazy, enzymu odgrywającego ważną rolę w detekcji prężności tlenu w tkankach przez hydrolizowanie AMP do adenozyiny, co z kolei może stymulować syntezę erytropoetyny [3].

6) **Synteza składników układu aktywacji plazminogenu** – Ludzkie komórki gwiaździste wątroby syntetyzują w hodowli wszystkie składniki układu aktywacji pla-

TABELA 2. cd.

2. Cytokiny i białka wiążące czynniki wzrostu	
Aktywina A	[14]
Czynnik komórek macierzystych tkanki łącznej (CTSCF)	[22]
Czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF)	[69]
Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF)	[27]
Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF)	[27]
Czynnik wzrostu nerwów (NGF)	[12]
Insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I)	[56]
Insulinopodobny czynnik wzrostu II (IGF-II)	[27]
Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) ^a	[27]
Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF)	[27]
Czynnik aktywujący płytki (PAF)	[40]
Transformujący czynnik wzrostu α (TGF- α)	[27]
Transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β 1, - β 2, - β 3)	[7,13]
Białka wiążące IGF: IGFBP-2, -3, -4, -5, -6 ^b	[24,56]
Białka wiążące TGF- β	[5,53]
Interleukina-1	[55]
Interleukina-6	[40]
Interleukina-8 (CINC)	[39]
Interleukina-10	[64,68]
MCP-1	[41]
M-CSF	[27]
MIP-2	[60]
3. Inne substancje	
Adrenomedulina	[25]
α_2 -makroglobulina	[27]
alfa B-kryształina	[11]
Apolipoproteina	[27]
BMP-6 (osteopontyna)	[34]
Endotelina-1	[52]
Epimorfina	[31]
Fibrylina-1	[17]
Leptyna	[45]
NO	[52]
Prostaglandyny (PGF _{2α} and PGD ₂) ^c	[33]
Proteaza aktywująca komplement P100	[36]

^a Obecność mRNA EGF wykazano w wątrobie oraz w izolowanych GKW i hepatocytach; ^b wykazano obecność mRNA IGFBP-6, ale nie samego białka; ^c po stymulacji przez ATP i noradrenalinę.

zminogenu (plazminogen typu urokinazowego i jego białko receptorowe, inhibitor aktywatora plazminogenu 1), a ich ekspresja jest regulowana w zróżnicowany sposób w drodze parakrynej i autokrynej przez takie czynniki wzrostu, jak PDGF i zasadowy FGF [20].

3. AKTYWACJA GWIAZDZISTYCH KOMÓREK WĄTROBY W WARUNKACH HODOWLI JAKO ODZWIERCIEDLENIE PRZEMIAN ZACHODZĄCYCH W WARUNKACH *IN VIVO*

Podczas hodowli na podłożach plastikowych trwającej dłużej niż 7 dni komórki gwiaździste uzyskują fenotyp komórek zaktywowanych, przypominających miofibroblasty. Ten proces spontanicznego przejścia od fenotypu „spoczynkowego” do fenotypu „aktywnego” określa się mianem „aktywacji” lub „transformacji” komórek gwiaździstych. Podobnie jak w sytuacji *in vivo*, także w warunkach *in vitro* aktywne GKW tracą wakuole lipidowe i rozpościerają się na podłożu tworząc cienkie wypustki zawierające mikrofilamenty o charakterze „włókien stresowych” [70]. Za morfologiczne wykładniki aktywacji GKW uważa się też wzmożoną ekspresję α -aktyny typu mięśni gładkich, desminy, nestyny i synaptofizyny [33,43]. W przeciwieństwie do komórek spoczynkowych aktywowane GKW wykazują ekspresję cząsteczki CD56, czyli N-CAM1 [40], jednak nieobecne jest w nich białko GFAP, należące do klasy filamentów pośrednich cytoszkieletu i stanowiące marker spoczynkowych komórek gwiaździstych [9].

Aktywacja komórek gwiaździstych *in vitro* przebiega z wyraźnym nasileniem syntezy różnych składników substancji pozakomórkowej, a także szeregu innych związków aktywnych biologicznie (tab. 1). Poznanie mechanizmów prowadzących do aktywowania GKW jest bardzo istotne ze względu na możliwość stosowania czynników przeciwdziałających temu procesowi w warunkach przewlekłego uszkodzenia wątroby przez czynniki chemiczne lub biologiczne. Obecnie zostaną krótko przedstawione niektóre procesy towarzyszące aktywacji GKW w hodowli.

W trakcie fenotypowej transformacji GKW dochodzi do zmiany ekspresji wielu receptorów komórkowych. Ilość receptora PPAR- γ , białka należącego do grupy jądrowych receptorów regulujących fenotyp komórek typu adypocytów, ulega zmniejszeniu w aktywowanych GKW, co może być przyczyną zanikania wakuoli lipidowych podczas aktywacji tych komórek [23]. Transformacji spoczynkowych komórek gwiaździstych w komórki o fenotypie miofibroblastów towarzyszy wielokrotny wzrost zawartości białka szoku termicznego, alfa B-krystaliny [11]. W trakcie aktywacji GKW dochodzi do pojawienia się na powierzchni komórek receptorów nieobecnych w komórkach spoczynkowych, takich jak receptory PDGF- β [21], TGF- β [21] oraz ferrytyny [48]. Stwierdzono, że wrażliwość receptorów TGF- β 1 [21], endoteliny-1 [50] i trombiny [40] wobec ich ligandów rosła wraz z postępującą aktywacją komórek gwiaździstych.

Transformacji hodowanych komórek gwiaździstych towarzyszy silny wzrost ekspresji TGF- β 2 oraz TGF- β 3, podczas gdy zawartość TGF- β 1, formy dominującej w prawidłowej wątrobie, nie ulega zmianie [13]. W aktywowanych GKW wykazano obecność cytokin, które nie występują w komórkach spoczynkowych: aktywiny-A [14], CTGF [69], IGF-I oraz białka wiążącego IGF [56]. Natomiast w miarę postępu aktywacji hodowanych komórek gwiaździstych dochodzi w nich do zaniku ekspresji HGF, obecnego w komórkach spoczynkowych [27].

W przeciwieństwie do spoczynkowych komórek gwiazdzistych, które są niewrażliwe na apoptozę indukowaną przez ligand Fas, aktywowane GKW są wrażliwe na ten typ zaprogramowanej śmierci komórkowej [27]. Podobnie do miofibroblastów w innych narządach, transformowane komórki gwiazdziste cechuje aktywność chemotaktyczna w odpowiedzi na obecność takich substancji, jak: PDGF [32], MCP-1 [41], zasadowy FGF [20] lub IGF-I [27].

Do jednego z najważniejszych procesów związanych z aktywacją komórek gwiazdzistych zarówno *in vivo* w uszkodzonej wątrobie, jak i *in vitro* w hodowanych komórkach należy nasilenie syntezy kolagenu wywołane zmianami na poziomie transkrypcji oraz translacji [21]. Wykazano, że półokres obrotu metabolicznego kolagenu $\alpha(1)$ I w aktywowanych komórkach gwiazdzistych był 20-krotnie wyższy niż w komórkach spoczynkowych [61].

Głębokim zmianom fenotypowym komórek gwiazdzistych towarzyszy aktywacja wielu czynników transkrypcyjnych, takich jak: AP-1, SP-1, *c-myc*, KLF6 oraz NF κ B [21]. Aktywowane komórki gwiazdziste wykazują ekspresję genów kontrolowanych przez NF κ B [17,29]. W procesie fenotypowej przemiany komórek gwiazdzistych mogą też uczestniczyć kinazy aktywowane przez stres, takie jak kinaza MAP p38 [49].

Uważa się, że aktywacja komórek gwiazdzistych *in vitro* odpowiada zmianie fenotypu tych komórek w trakcie ostrego lub przewlekłego uszkodzenia wątroby. Mimo prowadzenia intensywnych badań nad procesem aktywacji gwiazdzistych komórek wątroby, mechanizmy zapoczątkowujące tę przemianę, szczególnie w sytuacji *in vivo*, są ciągle słabo poznane. Ważną rolę w powstawaniu miofibroblastów ze spoczynkowych komórek gwiazdzistych odgrywają liczne parakrynnne i autokrynnne oddziaływania pomiędzy wszystkimi rodzajami komórek wątroby, które zachodzą za pośrednictwem takich mediatorów, jak: czynniki wzrostu, chemokiny i inne cytokiny, hormony tkankowe oraz produkty stresu oksydacyjnego. Zagadnienie to zostanie szerzej omówione w kolejnym artykule.

LITERATURA

- [1] ANKOMA-SEY V, MATLI M, CHANG KB, LALAZAR A, DONNER DB, WONG L, WARREN RS, FRIEDMAN SL. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998; 17: 115–121.
- [2] ARTHUR MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol* 2000; 279: G245–G249.
- [3] BACHMANN S. Erythropoietin gene (EPO) expression and EPO synthesis. *Kidney Int* 1997; 51: 479–482.
- [4] BATALLER R, NICOLAS JM, GINES P, ESTEVE A, NIEVES GORBIG M, GARCIA RAMALLO E, PINZANI M, ROS J, JIMENEZ W, THOMAS AP, ARROYO V, RODES J. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 615–624.
- [5] BAUER HU, FRIESS H, ABOU-SHADY M, BERBERAT P, ZIMMERMANN A, GOLD LI, KORC M, BREITKOPF K, LAHME B, TAG CG, GRESSNER AM. Expression and matrix deposition of latent transforming growth factor β binding proteins in normal and fibrotic rat liver and transdifferentiating hepatic stellate cells in culture. *Hepatology* 2001; 33: 387–396.

- [6] BENYON RC, HOVELL CJ, DA GACA M, JONES EH, IREDALE JP, ARTHUR MJ. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 1999; **30**: 977–986.
- [7] BISSELL DM, ROULLOT G, GEORG J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001; **34**: 859–867.
- [8] BUCHLER MW. Transforming growth factor betas and their receptors in human liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; **10**: 1031–1039.
- [9] BUNIATAN G, HAMPRECHT B, GEBHARDT R. Glial fibrillary acidic protein as a marker of perisinusoidal stellate cells that can distinguish between the normal and myofibroblast-like phenotypes. *Biol Cell* 1996; **87**: 65–73.
- [10] CARLONI V, ROMANELLI RG, PINZANI M, LAFFI G, GENTILINI P. Focal adhesion kinase and phospholipase $C\gamma$ involvement in adhesion and migration of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; **112**: 522–531.
- [11] CASSIMAN D, ROSKAMS T, VAN PELT J, LIBBRECHT L, AERTSEN P, CRABBE T, VANKELECOM H, DENEFC. Alpha B-crystallin expression in human and rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001; **35**: 200–207.
- [12] CASSIMAN D, DENEFC, DESMET VJ, ROSKAMS T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; **33**: 148–158.
- [13] DE BLESER PJ, NIKI T, ROGIERS V, GEERTS A. Transforming growth factor β gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997a; **26**: 886–893.
- [14] DE BLESER PJ, NIKI T, XU G, ROGIERS V, GEERTS A. Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 1997b; **26**: 905–912.
- [15] DUBUISSON L, LEPREUX S, BIOULAC-SAGE P, BALABAUD C, COSTA A-M, ROSENBAUM J, DESMOULIERE A. Expression and cellular localization of fibrillin-1 in normal and pathological human liver. *J Hepatol* 2001; **34**: 514–522.
- [16] ECKARDT KU, PUGH CW, MEIER M, TAN CC, RATCLIFFE PJ, KURTZ A. Production of erythropoietin by liver cells *in vivo* and *in vitro*. *Ann NY Acad Sci* 1994; **718**: 50–60.
- [17] ELSHARKAW AM, WRIGHT MC, HAY RT, ARTHUR MJP, HUGHES T, MATTHIAS J, BAHR MJ, DEGITZ K, MANN DA. Persistent activation of nuclear factor- κ B in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of NF κ B family proteins. *Hepatology* 1999; **30**: 761–769.
- [18] FEHRENBACH H, RALF WEISKIRCHEN R, KASPER M, GRESSNER AM. Up-regulated expression of the receptor for advanced glycation end products in cultured rat hepatic stellate cells during transdifferentiation to myofibroblasts. *Hepatology* 2001; **34**: 943–952.
- [19] FENNEKOHL A, SCHIEFERDECKER HL, JUNGERMANN K, PÜSCHEL GP. Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. *J Hepatol* 1999; **30**: 38–47.
- [20] FIBBI G, PUCCI M, GRAPPONE C, PELLEGRINI G, SALZANO R, CASINI A, MILANI S, DEL ROSSO M. Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatology* 1999; **29**: 868–878.
- [21] FRIEDMAN SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2247–2250.
- [22] GACA MDA, PICKERING JA, ARTHUR MJP, BENYON RC. Human and rat hepatic stellate cells produce stem cell factor: a possible mechanism for mast cell recruitment in liver fibrosis. *J Hepatol* 1999; **30**: 850–858.
- [23] GALLI A, CRABB D, PRICE D, CENI E, SALZANO R, SURRENTI C, CASINI A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; **31**: 101–108.
- [24] GENTILINI A, FELIERS D, PINZANI M, WOODRUFF K, ABOUD S. Characterization and regulation of insulin-like growth factor binding proteins in human hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 1998; **174**: 240–250.
- [25] GORBIG MN, GINES P, BATALLER R, NICOLAS JM, GARCIA-RAMALLO E, CEJUDO P, SANCHOBRU P, JIMENEZ W, ARROYO V, RODES J. Human hepatic stellate cells secrete adrenomedullin: potential autocrine factor in the regulation of cell contractility. *J Hepatol* 2001; **34**: 222–229.

- [26] GORBIG MN, GINES P, BATALLER R, NICOLAS JM, GARCIA RAMALLO E, TOBIAS E, TITOS E, REY MJ, CLARIA J, ARROYO V, RODES J. Atrial natriuretic peptide antagonizes endothelin-induced calcium increase and cell contraction in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; **30**: 501–509.
- [27] GRESSNER AM. The cell biology of liver fibrogenesis – an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998; **292**: 447–452.
- [28] HELLEMANS K, GRINKO I, ROMBOUTS K, SCHUPPAN D, GEERTS A. All-trans and 9-cis retinoic acid alter rat hepatic stellate cell phenotype differentially. *Gut* 1999; **45**: 134–142.
- [29] HELLERBRAND C, JOBIN C, LICATO LL, SARTOR RB, BRENNER DA. Cytokines induce NF- κ B in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 1998; **275**: G269–G278.
- [30] HERBST H, WEGE T, MILANI S, PELLEGRINI G, ORZECOWSKI HD, BECHSTEIN WO, NEUHAUS P, GRESSNER AM, SCHUPPAN D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997; **150**: 1647–1659.
- [31] HIROSE M, WATANABE S, OIDE H, KITAMURA T, MIYAZAKI A, SATO N. A new function of Ito cells in liver morphogenesis: evidence using a novel morphogenic protein, epimorphin, *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **225**: 155–160.
- [32] IKEDA K, WAKAHARA T, WANG YQ, KADAYA H, KAWADA N, KANEDA K. *In vitro* migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999; **29**: 1760–1767.
- [33] KMIEĆ Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; **161**: 1–151.
- [34] KNITTEL T, FELLMER P, MULLER L, RAMADORI G. Bone morphogenetic protein-6 is expressed in nonparenchymal liver cells and upregulated by transforming growth factor- β 1. *Exp Cell Res* 1997; **232**: 263–269.
- [35] KNITTEL T, MULLER L, SAILE B, RAMADORI G. Effect of tumour necrosis factor- α on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1997; **27**: 1067–1080.
- [36] KNITTEL T, KOBOLD D, SAILE B, GRUNDMANN A, NEUBAUER K, PISCAGLIA F, RAMADORI G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999; **117**: 1205–1221.
- [37] KNITTEL T, MEHDE M, KOBOLD D, SAILE B, DINTER C, RAMADORI G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β 1. *J Hepatol* 1999; **30**: 48–60.
- [38] LEVY MT, MCCAUGHAN GW, ABBOTT CA, PARK JE, CUNNINGHAM AM, MULLER E, RETTIG WJ, GORRELL MD. Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* 1999; **29**: 1768–1778.
- [39] MAHER JJ, LOZIER JS, SCOTT MK. Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and *in vivo*. *Am J Physiol* 1998; **275**: G847–G853.
- [40] MARRA F. Hepatic stellate cells and the regulation of inflammation. *J Hepatol* 1999; **31**: 1120–1130.
- [41] MARRA F, ROMANELLI RG, GIANNINI C, FAILLI P, PASTACALDI S, ARRIGHI MC, PINZANI M, LAFFI G, MONTALTO P, GENTILINI P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; **29**: 140–148.
- [42] MUSSO O, REHN M, SAARELA J, THERET N, LIETARD J, HINTIKKA, LOTRIAN D, CAMPION JP, PIHLAJANIEMI T, CLEMENT B. Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology* 1998; **28**: 98–107.
- [43] NIKI T, PEKNY M, HELLEMANS K, BLESER PD, BERG KV, VAEYENS F, QUARTIER E, SCHUIT F, GEERTS A. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; **29**: 520–527.
- [44] PINZANI M, CARLONI V, MARRA F, RICCARDI D, LAFFI G, GENTILINI P. Biosynthesis of platelet-activating factor and its 10-acyl analogue by liver fat-storing cells. *Gastroenterology* 1994; **106**: 1301–1311.
- [45] POTTER JJ, WOMACK L, MEZEY E, ANANIA FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **244**: 178–182.

- [46] RACINE-SAMSON L, ROCKEY DC, BISSELL DM. The role of $\alpha 1 \beta 1$ in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts *in vivo* and in primary culture. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30911–30917.
- [47] RADDATZ D, HENNEKEN M, ARMBRUST T, RAMADORI G. Subcellular distribution of glucocorticoid receptor in cultured rat and human liver-derived cells and cell lines: influence of dexamethasone. *Hepatology* 1996; **24**: 928–933.
- [48] RAMM GA, BRITTON RS, O'NEILL R, BACON BR. Identification and characterization of a receptor for tissue ferritin on activated rat lipocytes. *J Clin Invest* 1994; **94**: 9–15.
- [49] REEVES HL, THOMPSON MG, DACK CL, BURT AD, DAY CP. The role of phosphatidic acid in platelet-derived growth factor-induced proliferation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; **31**: 95–100.
- [50] REINEHR RM, KUBITZ R, PETERS REGEHR T, BODE JG, HAUSSINGER D. Activation of rat hepatic stellate cells in culture is associated with increased sensitivity to endothelin 1. *Hepatology* 1998; **28**: 1566–1577.
- [51] REYNAERT H, VAEYENS F, QIN H, HELLEMANS K, CHATTERJEE N, WINAND D, QUARTIER E, SCHUIT F, URBAIN D, KUMAR U, PATEL YD, GEERTS A (2000) Functionally active somatostatin receptor subtypes 1, 2 and 3 on activated rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2001; **121**: 915–930.
- [52] ROCKEY DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; **21**: 337–349.
- [53] ROTH S, SCHUREK J, GRESSNER AM. Expression and release of the latent transforming growth factor β binding protein by hepatocytes from rat liver. *Hepatology* 1997; **25**: 1398–1405.
- [54] SAILE B, KNITTEL T, MATTHES N, SCHOTT P, RAMADORI G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1265–1272.
- [55] SAKAMOTO M, UENO T, SUGAWARA H, TORIMURA T, TSUJI R, SUJAKU K, SATA M, TANIKAWA K. Relaxing effect of interleukin-1 on rat cultured Ito cells. *Hepatology* 1997; **25**: 1412–1417.
- [56] SCHARF JG, KNITTEL T, DOMBROWSKI F, MULLER L, SAILE B, BRAULKE T, HARTMANN H, RAMADORI G. Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; **27**: 1275–1284.
- [57] SCHLAF G, SCHIEFERDECKER HL, ROTHERMEL E, JUNGERMANN K, GOTZE O. Differential expression of the C5a receptor on the main cell types of rat liver as demonstrated with a novel monoclonal antibody and by C5a anaphylatoxin-induced Ca^{2+} release. *Lab Invest* 1999; **79**: 1287–1297.
- [58] SCHWALBE RF, SCHNABL B, KWEON YO, BRENNER DA CD40 activates NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001; **166**: 6812–6819.
- [59] SKRTIC S, WALLENIUS V, EKBERG S, BRENZEL A, GRESSNER AM, JANSSON JO. Insulin-like growth factors stimulate expression of hepatocyte growth factor but not transforming growth factor- $\beta 1$ in cultured hepatic stellate cells. *Endocrinology* 1997; **138**: 4683–4689.
- [60] SPRENGER H, KAUFMANN A, GARN H, LAHME B, GEMSA D, GRESSNER AM. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; **113**: 277–285.
- [61] STEFANOVIC B, HELLERBRAND C, HOLCIK M, BRIENDL M, ALIEBHABER S, BRENNER DA. Posttranscriptional regulation of collagen $\alpha 1(I)$ mRNA in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5201–5209.
- [62] SUEMATSU M, ODA M, SUZUKI H, KANEKO H, WATANABE N, FURUSHO T, MASUSHIGE S, TSUCHIYA M. Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvasc Res* 1993; **46**: 28–42.
- [63] TAKEMURA S, KAWADA N, HIROHASHI K, KINOSHITA H, INOUE M. Nucleotide receptors in hepatic stellate cells of the rat. *FEBS Lett* 1994; **354**: 54–56.
- [64] THOMPSON KC, TROWERN A, FOWELL A, MARATHE M, HAYCOCK C, ARTHUR MJ, SHERON N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *in vitro*. *Hepatology* 1998; **28**: 1518–1524.

- [65] TRIM N, MORGAN S, EVANS M, ISSA R, FINE D, AFFORD S, WILKINS B, IREDALE J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1235–1243.
- [66] VOGEL S, GAMBLE MV, BLANER WS. Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids. [W]: Nau H, Blaner WS (red.) *Retinoids: the Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*. Berlin, Springer Verlag 1999: 31–95.
- [67] WAKE K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 1980; **66**: 303–353.
- [68] WANG SC, OHATA M, SCHRUM L, RIPPE RA, TSUKAMOTO H. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 302–308.
- [69] WILLIAMS EJ, GACA MD, BRIGSTOCK DR, ARTHUR MJP, BENYON RC. Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; **32**: 754–761.
- [70] YEE HF JR. Rho directs activation-associated changes in rat hepatic stellate cell morphology *via* regulation of the actin cytoskeleton. *Hepatology* 1998; **28**: 843–850.
- [71] YOSHIJI H, KURIYAMA S, YOSHII J, IKENAKA Y, NOGUCHI R, NAKATANI T, TSUJINOUE H, FUKUI H. Angiotensin-II type I receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; **34**: 745–750.
- [72] ZHANG XY, SUN CK, WHEATLEY AM. A novel approach to the quantification of hepatic stellate cells in intravital fluorescence microscopy of the liver using a computerized image analysis system. *Microvasc Res* 2000; **60**: 232–240.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 23.05.2002 r.

Przyjęto: 08.07.2002 r.

Katedra Histologii i Immunologii AM

ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

E-mail: zkmiec@amg.gda.pl

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1215 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637
TEL: 773-936-3300
WWW.CHICAGO.LIBRARY.ORG

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1215 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637
TEL: 773-936-3300
WWW.CHICAGO.LIBRARY.ORG

ROLA KOMÓREK GWIAZDZISTYCH W REGULACJI FUNKCJI WĄTROBY. II. WSPÓŁDZIAŁANIE Z INNYMI KOMÓRKAMI W ROZWOJU WŁÓKNIENIA WĄTROBY

THE ROLE OF HEPATIC STELLATE CELLS IN THE REGULATION OF LIVER FUNCTIONS. II. COOPERATION WITH OTHER CELL TYPES IN THE DEVELOPMENT OF LIVER FIBROSIS

Zbigniew KMIEĆ

Katedra Histologii i Immunologii, Zakład Histologii, Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie: Komórki gwiazdiste wątroby odgrywają kluczową rolę w rozwoju zwłóknienia wątroby, procesu charakteryzującego się ilościowymi i jakościowymi zmianami w składzie i rozmieszczeniu macierzy pozakomórkowej. Pod wpływem związków uwalnianych z uszkodzonych hepatocytów oraz z komórek Browicza-Kupffera, płytek krwi, krwinek białych i komórek śródbłonna dochodzi do transformacji (aktywacji) spoczynkowych komórek gwiazdzystych w komórki o fenotypie miofibroblastów. W wyniku aktywacji w komórkach gwiazdzystych zanikają wakuole lipidowe, komórki proliferują, migrują na obwód płacika oraz syntetyzują duże ilości makrocząsteczek macierzy pozakomórkowej, co doprowadza do zwłóknienia, a ostatecznie do marskości wątroby. Chociaż głównym mitogenem dla komórek gwiazdzystych jest PDGF, zaś TGF- β stanowi najsilniejszy związek fibrogeny, to w procesie aktywacji tych komórek i postępującym włóknieniu wątroby uczestniczy wiele innych substancji działających głównie w drodze parakrynej i autokrynej. Po usunięciu czynnika uszkadzającego wątrobę może dojść do cofnięcia się początkowych etapów włóknienia wskutek aktywacji tkankowych metaloproteinaz wydzielanych przez komórki gwiazdiste oraz zmniejszenia liczby tych komórek wskutek apoptozy aktywowanej przez receptor Fas. Zahamowanie aktywacji komórek gwiazdzystych lub szlaków transdukcji sygnałów uaktywnianych przez substancje profibrogenne może się w przyszłości okazać przydatne w terapii zwłóknienia wątroby.

Słowa kluczowe: gwiazdiste komórki wątroby, zwłóknienie wątroby, oddziaływania międzykomórkowe.

Summary: Hepatic stellate cells play a key role in the initiation and progression of liver fibrosis that is characterized by profound changes in the amount and distribution of the extracellular matrix (ECM). Various mediators released from damaged hepatocytes and activated liver macrophages, sinusoidal endothelial cells, infiltrating leukocytes, and platelets activate quiescent, vitamin A-rich stellate cells into

myofibroblast-like cells. The activated or transformed stellate cells lose lipid droplets, proliferate, migrate, contract and synthesize large amounts of ECM components. PDGF and TGF- β represent, respectively, the most mitogenic and profibrogenic cytokines that act on stellate cells. However, many other substances derived from various liver cell types increase secretory activity of stellate cells that results in excessive ECM accumulation. The early stages of liver fibrosis may be reversible due to the apoptosis-related death of activated stellate cells, their reversal to the quiescent phenotype, and activation of matrix metalloproteinases. Blocking of some signal transduction pathways involved in the profibrogenic activity of stellate cells may provide new ways for the more effective therapy of liver fibrosis.

Key words: hepatic stellate cells, liver fibrosis, cellular cross-talk.

Włóknienie wątroby można uważać za proces stanowiący odpowiedź na stan przewlekłego uszkodzenia narządu spowodowanego przez różne czynniki, takie jak: choroby metaboliczne, infekcje wirusowe, nadużycie alkoholu lub toksyczne działanie niektórych związków chemicznych. Proces ten charakteryzują jakościowe oraz ilościowe zmiany w rozmieszczeniu składników substancji międzykomórkowej. W warunkach prawidłowych wyróżniane są dwie główne komponenty macierzy pozakomórkowej: przestrzeń okołozatokowa (Dissego) oraz przestrzenie wrotne. Pierwsza z nich wypełniona jest amorficznym materiałem (o niskiej gęstości mikroskopowo-elektronowej) zawierającym cząsteczki włóknistego kolagenu typu I, II, V i VI, niewłóknistego kolagenu typu IV i XVIII oraz cząsteczki proteoglikanów i białek, takich jak: perlekan, fibronektyna, tenascyna-C, laminina, nidogen i siarczan heparanu. Z kolei przestrzenie wrotne (a także torebka wątroby i otoczenie żył środkowych) wypełnione są materiałem elektronowogęstym zawierającym znacznie więcej cząsteczek włóknistego kolagenu niż w przestrzeni Dissego [65]. W trakcie włóknienia wątroby dochodzi do znacznego wzrostu objętości macierzy pozakomórkowej, głównie w obrębie przestrzeni wrotnych oraz w przestrzeniach okołozatokowych, przy czym całkowita zawartość kolagenowych i niekolagenowych składników macierzy rośnie prawie dziesięciokrotnie [57]. Podczas wątrobowej fibrogenyzy amorficzny materiał wypełniający przestrzeń Dissego zostaje zastąpiony dużą ilością włóknistych makrocząsteczek kolagenu. Procesowi temu towarzyszy zanik fenestracji w komórkach śródbłonna zatok i zanik mikrokosmków hepatocytów, co prowadzi do upośledzenia funkcji hepatocytów i zaburzeń w mikrokrążeniu wątroby [57]. Gwiazdziste komórki wątroby (GKW), których funkcje w warunkach prawidłowych związane są m.in. z syntezą i degradacją składników macierzy pozakomórkowej [38], odgrywają główną rolę w zapoczątkowaniu i podtrzymywaniu procesu włóknienia wątroby [16,24]. W wyniku ostrego lub przewlekłego uszkodzenia wątroby komórki gwiazdziste ulegają tzw. aktywacji lub transformacji, która prowadzi do zmiany ich morfologii i funkcji. Transformacja GKW wyraża się utratą wakuoli lipidowych, zmianą kształtu z gwiazdzistego na wydłużony, typowy dla miofibroblastów [24], zwiększoną proliferacją oraz migracją tak przekształconych komórek do miejsca uszkodzenia narządu [16]. W przypadku ostrego, jednorazowego uszkodzenia wątroby dochodzi zwykle do przerwania nadmiernej aktywności komórek gwiazdzistych i ich powrotu do fenotypu komórek spoczynkowych. Przewlekłe uszkodzenie narządu doprowadza natomiast do przedłużonej aktywacji GKW, co, wraz z postępującym

nagromadzeniem się składników macierzy pozakomórkowej, doprowadza do zwłóknienia, a w końcu do marskości wątroby [57]. Kluczową rolę komórek gwiaździstych w rozwoju zwłóknienia wątroby sugeruje występowanie korelacji pomiędzy ilością miofibroblastów wątroby a stopniem zwłóknienia narządu, którą obserwowano u pacjentów chorych na zapalenie wątroby typu C [62], jak również w doświadczalnych modelach włóknienia i marskości wątroby [79].

1. CZYNNIKI WYWOŁUJĄCE AKTYWACJĘ GWIAZDZISTYCH KOMÓREK WĄTROBY

Włóknienie wątroby stanowi dynamiczny proces, który jest ściśle powiązany z wielkością i czasem trwania uszkodzenia hepatocytów. Ciąg zdarzeń zapoczątkowujących włóknienie wątroby inicjowany jest *in vivo* przez różne czynniki właściwe dla różnych rodzajów uszkodzenia narządu. Proces kluczowy dla zapoczątkowania włóknienia wątroby, czyli transformacja spoczynkowych komórek gwiaździstych w aktywne komórki o charakterze miofibroblastów, wywołany zostaje przez uwolnienie z uszkodzonych hepatocytów, komórek Kupffera lub komórek śródbłonka zatok wątrobowych wielu substancji o działaniu parakrynnym i autokrynnym. Większość informacji o mechanizmach aktywacji komórek gwiaździstych uzyskano w badaniach przeprowadzonych w warunkach hodowli komórkowej, ponieważ uważa się, że zachodzący spontanicznie *in vitro* proces transformacji tych komórek odpowiada przebiegającym *in vivo* procesom ich aktywacji [16,24]. Mimo zasadniczej poprawności takiego podejścia, należy zaznaczyć, że prawdopodobnie nie wszystkie obserwacje poczynione na modelach komórkowych w pełni odpowiadają zmianom zachodzącym *in vivo* podczas uszkodzenia wątroby [4,13].

Proliferacja komórek gwiaździstych, obserwowana *in vivo* zarówno podczas uszkodzenia wątroby ludzkiej [62], jak i w modelach doświadczalnych włóknienia tego narządu jest najsilniej stymulowana w warunkach hodowli przez płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) uwalniany w wątrobie przez komórki Kupffera i płytki krwi [17,24]. Mitogeny PDGF ulega wzmocnieniu poprzez wzrost ilości receptorów PDGF na komórkach gwiaździstych obserwowany zarówno w trakcie przewlekłych chorób wątroby u ludzi, jak i w doświadczalnym włóknieniu [57]. Niezależnie od działania mitogenego PDGF [8], a także zasadowy FGF [15] wykazują również aktywność chemotaktyczną, która prowadzi do migracji komórek gwiaździstych do miejsc uszkodzenia narządu. Białko chemotaktyczne dla monocytów, MCP-1, uwalniane przez aktywowane komórki gwiaździste, stymuluje nie tylko migrację monocytów i limfocytów, lecz również migrację samych komórek gwiaździstych [48]. W sytuacji przewlekłego uszkodzenia wątroby takie działanie MCP-1 może dodatkowo „rekrutować” (ściągać) GKW do miejsc uszkodzenia wątroby i w ten sposób przyczyniać się do rozwoju zwłóknienia narządu. Niektóre substancje pobudzające i hamujące podziały GKW wymieniono w tabeli 1.

Podobnie jak w przypadku włóknienia innych tkanek i narządów [67], transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β) jest najbardziej fibrynogennym mediatorem aktywnym w procesie włóknienia wątroby [16,24]. Świadczą o tym m.in. badania przeprowadzone na transgenicznym myszach, u których przewlekła produkcja TGF- β 1 wywoływała włóknienie wątroby i nerek przebiegające ze wzrostem odkładania kolagenu i apoptozą hepatocytów [63]. Rolę tej cytokiny w rozwoju zwłóknienia wątroby potwierdzają też pośrednio badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu TGF- β , u których wykazano znacznie zmniejszone nagromadzenie kolagenu w odpowiedzi na uszkodzenie wątroby [26]. Wzmoczoną ekspresję TGF- β w komórkach gwiaździstych obserwowano zarówno w przewlekłych chorobach wątroby, jak i w doświadczalnym włóknieniu tego narządu [57]. Uważa się, że TGF- β 1 zaburza w uszkodzonej wątrobie równowagę pomiędzy odkładaniem a degradacją składników macierzy pozakomórkowej. Cytokina ta pobudza transformację spoczynkowych GKW w komórki typu miofibroblastów [24]. W aktywowanych komórkach gwiaździstych TGF- β nasila syntezę białek i proteoglikanów macierzy pozakomórkowej, zmniejsza produkcję enzymów degradujących makrocząsteczki macierzy (kolagenaz i innych metaloproteinaz) [38] oraz stymuluje syntezę tkankowych inhibitorów metaloproteinaz [3]. Chociaż TGF- β nie wywiera bezpośredniego efektu na proliferację i migrację komórek gwiaździstych [24], cytokina ta może w sposób pośredni działać mitogennie poprzez indukcję receptorów PDGF na komórkach gwiaździstych [57]. Obok TGF- β także inne związki zwiększają syntezę składników substancji międzykomórkowej przez aktywowane gwiaździste komórki wątroby (tab. 1).

2. ODDZIAŁYWANIA MIĘDZYKOMÓRKOWE PODCZAS AKTYWACJI KOMÓREK GWIAZDZISTYCH I POSTĘPUJĄCEGO WŁÓKNIENIA WĄTROBY

Wiele zmian przebiegających w zaktywowanych komórkach gwiaździstych odgrywa istotną rolę w zapoczątkowaniu odpowiedzi profibrynogennej w uszkodzonej wątrobie. Zmiany te wywoływane są uwalnianiem cytokin i innych czynników zarówno przez aktywowane komórki gwiaździste [38], jak i przez inne rodzaje komórek wątrobowych [37]. Rolę oddziaływań autokrynych dla podtrzymania aktywacji komórek gwiaździstych wykazano na przykładzie PDGF [45,57], FGF [15], TGF- β [2] oraz endoteliny-1 [44]. Uważa się jednak, że główna rola w zapoczątkowaniu aktywacji komórek gwiaździstych przypada czynnikom działającym w drodze parakrynej, które uwalniane są lokalnie z uszkodzonych hepatocytów i aktywowanych makrofagów wątroby, komórek śródbłonna zatok, płytek krwi oraz z komórek jednojądrzastych napływających do wątroby (ryc. 1).

Najsilniejszą stymulację syntezy składników macierzy pozakomórkowej w hodowlach GKW obserwowano wówczas, kiedy medium hodowlane wzbogacano

równocześnie w bezkomórkowy przesącz uzyskiwany z hodowli hepatocytów i komórek Kupffera, efekt osobno dodawanych przesączów był mniejszy [23,37]. W podobnych doświadczeniach udało się częściowo scharakteryzować mediatory aktywujące komórki gwiazdziste. Na przykład, TGF- β uwalniany z komórek Browicza-Kupffera powodował transformację spoczynkowych komórek gwiazdzistych w komórki o fenotypie miofibroblastów oraz zwiększał w nich syntezę makrocząsteczek matriksu poza-komórkowej [5,24]. W niektórych modelach uszkodzenia wątroby reaktywne związki tlenu uwalniane z hepatocytów oraz granulocytów obojętnochłonnych pobudzały fibrogenezę w komórkach gwiazdzistych [9,53], a także indukowały w nich syntezę MCP-1, białka chemotaktycznego dla monocytów [77]. Jak wspomniano, MCP-1 odgrywa ważną rolę w rozwoju zmian zapalnych w wątrobie przez chemoatrakcję nie tylko monocytów i limfocytów, lecz także spoczynkowych komórek gwiazdzistych [48]. W warunkach *in vitro* w pełni aktywowane komórki gwiazdziste odpowiadają na obecność endotoksyny bakteryjnej (LPS) wzrostem ekspresji MCP-1 [70]. Obserwacja ta sugeruje, że im więcej komórek gwiazdzistych ulega aktywacji w warunkach *in vivo*, tym silniej wątroba reaguje na działanie endotoksyn, co może prowadzić do zwiększonej syntezy czynników chemotaktycznych i nasilenia zmian zapalnych. Jedno z wielu oddziaływań autokrynych, które podtrzymują fibrynogenną aktywność komórek gwiazdzistych, oparte jest na stymulowaniu przez TGF- β , wydzielany m.in. przez komórki gwiazdziste, syntezy w tych komórkach MCP-1 oraz składników macierzy pozakomórkowej, przy czym zmiana składu macierzy może pobudzać dalszą sekrecję MCP-1 [48]. Inny rodzaj autokrynych interakcji istotnych dla aktywacji komórek gwiazdzistych polega na zwiększeniu przez TGF- β stabilizacji mRNA ECE-1 (enzymu konwertującego preproendotelinę do endoteliny-1), co prowadzi do wzmożonej syntezy endoteliny-1 w komórkach gwiazdzistych [66]. Z kolei endotelina-1, syntetyzowana w wątrobie przez komórki śródbłonna i komórki gwiazdziste, także aktywuje komórki gwiazdziste zarówno bezpośrednio, jak i poprzez indukowanie syntezy TGF- β [16].

Aktywacja komórek Kupffera stanowi, obok uszkodzenia hepatocytów, inne krytyczne zdarzenie w inicjowaniu (przyczynę inicjowania) włóknienia wątroby. W warunkach *in vivo* szybkie gromadzenie się komórek Kupffera często poprzedza aktywację komórek gwiazdzistych [34]. Komórki Kupffera oraz komórki gwiazdziste stanowią najważniejsze miejsca syntezy TGF- β w wątrobie [11]. Ponadto komórki Kupffera wydzielają wiele innych cytokin, takich jak: PDGF, TNF- α , IL-6 oraz TGF- α [37], które wpływają modulująco na proliferację i zmianę fenotypu komórek gwiazdzistych (tab. 1). TNF- α stymuluje transformację spoczynkowych komórek gwiazdzistych w miofibroblasty oraz w zróżnicowany sposób wpływa na aktywność sekrecyjną tych komórek: nasila syntezę takich składników macierzy pozakomórkowej, jak fibronektyna i tenascyna [39], ale równocześnie zmniejsza ekspresję kolagenu typu I [27,29] i typu III [39]. Wydaje się, że we wstępnym etapie włóknienia wątroby TNF- α mógłby pobudzać degradację składników macierzy pozakomórkowej przez nasilenie ekspresji metaloproteinaz w komórkach gwiazdzistych, natomiast w trakcie postępującego włóknienia narządu cytokina ta mogłaby zmniejszać degradację macierzy w wyniku indukowania syntezy inhibitora metaloproteinaz (TIMP) w tych komórkach

TABELA 1. Substancje wpływające na proliferację gwiaździstych komórek wątroby i syntezę makrocząsteček macierzy pozakomórkowej przez te komórki

Związki stymulujące proliferację komórek gwiaździstych	
PDGF- β	[45,58]
TGF- β ^a	[57]
b-FGF ^b	[59]
IGF-1	[71]
VEGF	[2]
Aktywne związki tlenu	[53]
Kwas 9- <i>cis</i> -retinowy	[25]
Sfingozyno-1-fosforan	[10,28]
Trombina	[45,46]
Wazopresyna	[6]
ANP	[21]
Amiloryd	[7]
Związki hamujące proliferację komórek gwiaździstych	
Interferon- γ oraz interferon- α	[43]
TNF- α	[39,61]
TGF- β ^c	[12,61]
LPS	[36,37]
Prostaglandyna E2	[10,45]
Endotelina-1	[44]
Ligandy PPAR- γ	[18]
Donory tlenu azotu ^d	[14]
Rapamycyna ^e	[78]
Inhibitory GTPazy RhoA	[32]
Związki stymulujące fibrogenezę w aktywowanych komórkach gwiaździstych	
TGF- β 1	[5]
Aktywne związki tlenu	[9,41]
Aldehyd octowy	[1]
Kwas 9,13- <i>di-cis</i> retinowy ^f	[55]
TNF- α ^g	[53,39]
IGF-1	[71]
IL-6	[22]
Onkostatyna M	[42,68]
Związki hamujące fibrogenezę w aktywowanych komórkach gwiaździstych	
HGF	[49,56]
Interferon- γ oraz interferon- α	[43]
TNF- α	[29]
Endotelina-1	[44]
Kwas <i>trans</i> retinowy ^h	[25]
Relaksyna	[76]
Inhibitor proteaz ⁱ	[54]
Donory tlenu azotu	[9]
α_2 -makroglobulina	[64]

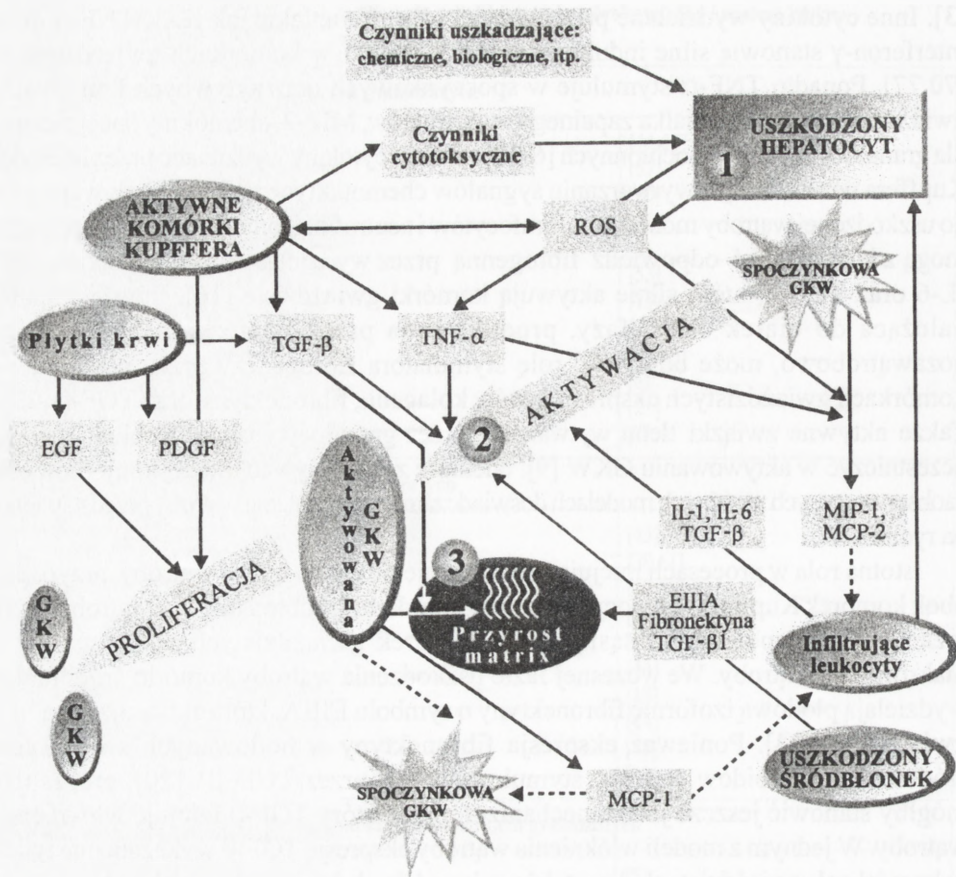
^a i in. – patrz notka na stronie obok

[3]. Inne cytokiny wydzielane przez komórki Kupffera, takie jak IL-1, TNF- α oraz interferon- γ stanowią silne induktory syntezy MCP-1 w komórkach gwiaździstych [70,77]. Ponadto TNF- α stymuluje w spoczynkowych oraz aktywnych komórkach gwiaździstych syntezę białka zapalnego makrofagów, MIP-2, chemokiny specyficznej dla granulocytów obojętnochłonnych [69]. Tak więc, cytokiny wydzielane przez komórki Kupffera uczestniczą w wytwarzaniu sygnałów chemotaktycznych dla napływających do uszkodzonej wątroby monocytów, limfocytów i neutrofilii. Komórki nacieku zapalnego mogą z kolei nasilać odpowiedź fibrogenną przez wydzielanie cytokin, takich, jak: IL-6 oraz TGF- β , które silnie aktywują komórki gwiaździste [16]. Interleukina 6, należąca do białek ostrej fazy, produkowana przez komórki Kupffera oraz pozawątrobowo, może odgrywać rolę stymulatora fibrogenyzy przez nasilenie w komórkach gwiaździstych ekspresji genów kolagenu, fibronektyny oraz TGF- β [22]. Także aktywne związki tlenu wytwarzane przez granulocyty obojętnochłonne mogą uczestniczyć w aktywowaniu GWK [9]. Niektóre z oddziaływań międzykomórkowych zaobserwowanych w różnych modelach doświadczalnego włóknienia wątroby przedstawiono na rycinie 1.

Istotna rola w procesach inicjujących włóknienie uszkodzonej wątroby, przypada, obok komórek Kupffera i leukocytów krwi, komórkom śródbłonka zatok wątrobowych leżących w bezpośrednim sąsiedztwie komórek gwiaździstych, hepatocytów i makrofagów wątroby. We wczesnej fazie uszkodzenia wątroby komórki śródbłonka wydzielają płodową izoformę fibronektyny o symbolu EIIIA, która aktywuje komórki gwiaździste [33]. Ponieważ ekspresja fibronektyny w hodowanych komórkach śródbłonka sinusoidów wątroby stymulowana jest przez TGF- β 1 [20], proces ten mógłby stanowić jeszcze jeden mechanizm, przez który TGF- β inicjuje włóknienie wątroby. W jednym z modeli włóknienia wątroby ekspresję TGF- β wykazano nie tylko w komórkach gwiaździstych, lecz także w komórkach śródbłonka zatok [11].

Obok hepatocytów i komórek niemięszkowych wątroby, innym ważnym źródłem aktywatorów wątrobowej fibrogenyzy są płytki krwi wydzielające PDGF, TGF- β 1 oraz EGF [24]. W wyniku aktywacji płytki krwi wydzielają fosforan sfingozyny (S1P), mediator lipidowy, który działa mitogenicznie na komórki gwiaździste oraz obkurcza matrycę kolagenową, na których hodowane są te komórki [28]. Ponieważ w ostrym uszkodzeniu wątroby dochodzi do rozpadu płytek krwi, wydaje się, że również S1P mógłby odgrywać pewną rolę w zapoczątkowaniu procesu włóknienia wątroby.

Objaśnienia do tabeli 1: ^a efekt pośredni przez indukowanie receptorów PDGF; ^b wpływ pośredni; ^c obserwowano różną aktywność cytokiny w zależności od stopnia aktywacji GWK; ^d działanie pośrednie przez zahamowanie mitogenicznego efektu PDGF w wyniku wzrostu stężenia cAMP w GWK; ^e działanie pośrednie przez zahamowanie mitogenicznego efektu PDGF; ^f efekt wywołany przez aktywację latentnego TGF- β w GWK; ^g TNF- α stymulował syntezę fibronektyny i tenascyny [5,39] oraz zmniejszał całkowitą syntezę kolagenu w hodowlach GWK [27]; ^h kwas retinowy zmniejszał aktywację promotora kolagenu $\alpha_1(I)$, ale nie wpływał na aktywację promotora kolagenu $\alpha_2(I)$ w hodowlach GWK; ⁴¹ efekt pośredni poprzez zahamowanie powstawania aktywnego TGF- β .



RYCINA 1. Hipotetyczny model mechanizmów aktywacji komórek gwiaździstych (GKW) zapoczątkowujących włóknienie wątroby. We wstępnym, przedzapalnym etapie dochodzi do uszkodzenia hepatocytów (1), które uwalniają substancje stymulujące transformację spoczynkowych komórek gwiaździstych w aktywne komórki o fenotypie miofibroblastów (aktywowane GKW). Aktywacja GKW ulega przedłużeniu (2) w trakcie rozwoju zapalenia wątroby wskutek działania mediatorów uwalnianych z różnych rodzajów komórek, niektóre z tych mediatorów wywierają też efekt mitogenny wobec komórek gwiaździstych. Aktywowane komórki Kupffera i leukocyty nacieku zapalnego mogą dodatkowo uszkadzać hepatocyty uwalniając aktywne związki tlenu (ROS) i proteazy. W końcowym etapie przedłużającego się naprawczego odczynu tkankowego w pełni aktywne komórki gwiaździste uwalniają szereg cytokin i innych związków, których działanie doprowadza do nadmiernej depozycji składników matriks pozakomórkowej (3). Przedstawiono tylko najważniejsze mediatory uczestniczące w oddziaływaniach międzykomórkowych. (Linie przerywane oznaczają efekt chemotaktyczny)

Niezależnie od przedstawionych parakrynnych oddziaływań międzykomórkowych, aktywacja komórek gwiaździstych jest silnie pobudzana również wskutek autokrynnego działania wymienionych cytokin oraz hamowana przez inne związki, wymienione w tabeli 1, spośród których endotelina-1, HGF, MCP-1, TGF-β są również produktami komórek gwiaździstych. Tak więc, postępujący charakter procesu włóknienia wątroby

jest rezultatem nie tylko aktywowania spoczynkowych komórek gwiazdzistych przez substancje uwalniane z innych komórek obecnych w uszkodzonej wątrobie, ale wynika też z powtarzania się cykli autokrynnej aktywacji, na które wywierają wpływ również substancje hamujące aktywność proliferacyjną i sekrecyjną komórek gwiazdzistych.

3. CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA REGRESJĘ ZMIAN WYTWÓRCZYCH W POCZĄTKOWYM ETAPIE WŁÓKNIENIA WĄTROBY

Włóknienie wątroby ma charakter dynamicznego procesu, który charakteryzuje zaburzenie równowagi pomiędzy zwiększonym wydzielaniem składników macierzy pozakomórkowej i zmniejszoną degradacją macierzy. Wiadomo, że wywołanie doświadczalnego zwłóknienia, a w dalszej kolejności także marskości wątroby, wymaga stosunkowo długiego okresu podawania substancji uszkadzającej narząd, takiej jak np. czterochlorek węgla lub etanol. Wykazano ostatnio, że włóknienie wątroby może mieć charakter odwracalny, ponieważ usunięcie hepatotoksyny we wczesnym okresie fibrogenyzy może zapoczątkować proces remodelowania zmienionej macierzy pozakomórkowej w kierunku prawidłowej struktury histologicznej narządu [30]. Podobne zjawisko rekonstrukcji zmienionej architektoniki wątroby zaobserwowano w czasie leczenia interferonem chorych, u których włóknienie wątroby powiązane było z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C [62].

Odwracalny charakter wczesnych etapów rozwoju włóknienia wątroby w modelu intoksykacji czterochlorkiem węgla związany jest głównie z powrotem zaktywowanych komórek gwiazdzistych o charakterze miofibroblastów do fenotypu nieaktywnych, spoczynkowych komórek oraz z eliminacją miofibroblastów na drodze apoptozy [30,60]. Apoptoza tych komórek obserwowana po ostrym uszkodzeniu wątroby zachodziła wskutek aktywacji receptora Fas [60,61]. Dodatkowo, apoptozie komórek gwiazdzistych towarzyszy zmniejszona ekspresja tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP) [3,30,72], co prowadzi do wzrostu aktywności kolagenaz i degradacji składników macierzy pozakomórkowej, procesu niezbędnego do przywrócenia normalnej budowy histologicznej narządu. Tak więc, apoptoza może stanowić ważny mechanizm, poprzez który regulowana jest nadmierna proliferacja aktywnych komórek gwiazdzistych. Wykazano, że profibrogenne cytokiny, TGF- β oraz TNF- α [61], insulinopodobny czynnik wzrostu-1 [31], a także tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 [50] hamowały spontaniczną apoptozę komórek gwiazdzistych w hodowli, co przedłużało aktywację komórek gwiazdzistych i sprzyjało zwiększonej produkcji składników macierzy pozakomórkowej. Można przypuszczać, że antyapoptotyczne i antyproliferacyjne efekty TGF- β oraz TNF- α mogą stanowić ważny składnik mechanizmów przedłużania aktywacji komórek gwiazdzistych w stanach przewlekłego uszkodzenia wątroby.

Do czynników, które potencjalnie mogą uczestniczyć w zjawisku odwracalności włóknienia wątroby, mogą należeć przeciwzapalne cytokiny wydzielane przez niemiędzyszowe komórki wątroby. Indukcję syntezy IL-10 obserwowano w aktywnych komórkach gwiazdzistych [73,75] i komórkach Kupffera [40], przy czym zawartość tej cytokiny we włókniejącej wątrobie chorych na zapalenie wywołane wirusem typu C była obniżona [51]. Wykazano, że IL-10 zmniejszała produkcję TNF- α w makrofagach wątroby [40]; efekt ten mógłby prowadzić do hamowania włóknienia wątroby, ponieważ TNF- α stymuluje syntezę składników macierzy pozakomórkowej w komórkach gwiazdzistych [39]. Interferon- γ , produkt aktywowanych monocytów i limfocytów, hamował zarówno aktywację, jak i proliferację komórek gwiazdzistych i zmniejszał w nich ekspresję takich białek macierzy pozakomórkowej, jak: fibronektyna, tenascyna i kolagen typu III [39]. Obserwacje te sugerują, że IL-10 oraz IFN- γ mogą pełnić ważną rolę w rewersji włóknienia wątroby w kierunku prawidłowego fenotypu, także w trakcie przewlekłej choroby wątroby [52]. Redukcję włóknienia wątroby osiągnięto także hamując aktywność komórek gwiazdzistych przez podanie szeregiem rozpuszczalnego receptora TGF- β typu II, który był przyłączony do ludzkiej IgG [19]. Miejscowe wprowadzenie wektora adenowirusa z wbudowanym rozpuszczalnym receptorem TGF- β również prowadziło do powstrzymania włóknienia wątroby [74]. Wspomniane próby pozwalają żywić nadzieję, że zablokowanie wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału przez związki antagonizujące działanie TGF- β i innych substancji profibrynogennych pozwoli na opracowanie bardziej efektywnych niż dotychczas dostępne sposobów leczenia włóknienia wątroby i zapobiegania powstaniu marskości tego narządu.

LITERATURA

- [1] ANANIA FA, WOMACK L, JIANG M, SAXENA NK. Aldehydes potentiate $\alpha_2(1)$ collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radical Biol Med* 2001; **30**: 846–857.
- [2] ANKOMA-SEY V, MATLI M, CHANG KB, LALAZAR A, DONNER DB, WONG L, WARREN RS, FRIEDMAN SL. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998; **17**: 115–121.
- [3] ARTHUR MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol* 2000; **279**: G245–G249.
- [4] BACH KRISTENSEN D, KAWADA N, IMAMURA K, MIYAMOTO Y, TATENO C, SEKI S, KUROKI T, YOSHIKATO K. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; **32**: 268–277.
- [5] BACHEM MG, SELL KM, MELCHIOR R, KROPF J, ELLER T, GRESSNER AM. Tumor necrosis factor α (TNF α) and transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. *Virchows Arch B* 1993; **63**: 123–130.
- [6] BATALLER R, NICOLAS JM, GINES P, ESTEVE A, NIEVES GORBIG M, GARCIA RAMALLO E, PINZANI M, ROS J, JIMENEZ W, THOMAS AP, ARROYO V, RODES J. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; **113**: 615–624.

- [7] BENEDETTI A, DI SARIO A, CASINI A, RIDOLFI A, BENDIA E, PIGINI P, TONNINI C, D'AMBROSIO L, FELICIANGELI G, MACARRI G, SVEGLIATI-BARONI G. Inhibition of the Na^+/H^+ exchanger reduces rat hepatic stellate cell activity and liver fibrosis: an *in vitro* and *in vivo* study. *Gastroenterology* 2001; **120**: 545–556.
- [8] CARLONI V, ROMANELLI RG, PINZANI M, LAFFI G, GENTILINI P. Focal adhesion kinase and phospholipase C γ involvement in adhesion and migration of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; **112**: 522–531.
- [9] CASINI A, CENI E, SALZANO R, BIONDI P, PAROLA M, GALLI A, FOSCHI M, CALIGIURI A, PINZANI M, SURRENTI C. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; **25**: 361–367.
- [10] DAVAILLE J, GALLOIS C, HABIB A, LI L, MALLAT A, TAO J, LEVADE T, LOTERSZTAJN S. Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J Biol Chem* 2000; **275**: 34628–34633.
- [11] DE BLESER PJ, NIKI T, ROGIERS V, GEERTS A. Transforming growth factor β gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; **26**: 886–893.
- [12] DOOLEY S, DELVOUX B, LAHME B, MANGASSER-STEPHAN K, GRESSNER AM. Modulation of transforming growth factor- β response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; **31**: 1094–1106.
- [13] DOOLEY S, DELVOUX B, STRECKERT M, BONZEL L, STOPA M, DIJKE P, GRESSNER AM. Transforming growth factor β signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. *FEBS Letters* 2001; **502**: 4–10.
- [14] FAILLI P, DEFRANCO RMS, CALIGURI A, GENTILINI A, ROMANELLI RG, MARRA F, BATIGNANI G, GUERRA CT, LAFFI G, GENTILINI P, PINZANI M. Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; **119**: 479–492.
- [15] FIBBI G, PUCCI M, GRAPPONE C, PELLEGRINI G, SALZANO R, CASINI A, MILANI S, DEL ROSSO M. Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatology* 1999; **29**: 868–878.
- [16] FRIEDMAN SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2247–2250.
- [17] FRIEDMAN SL, ARTHUR MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1780–1785.
- [18] GALLI A, CRABB D, PRICE D, CENI E, SALZANO R, SURRENTI C, CASINI A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; **31**: 101–108.
- [19] GEORGE J, ROULOT D, KOTELIANSKY VE, BISSELL DM. *In vivo* inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor- β type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12719–12724.
- [20] GEORGE J, WANG SS, SEVCSIK AM, SANICOLA M, CATE RL, KOTELIANSKY VE, BISSELL DM. Transforming growth factor- β initiates wound repair in rat liver through induction of the EIIIA-fibronectin splice isoform. *Am J Pathol* 2000; **156**: 115–124.
- [21] GORBIG MN, GINES P, BATALLER R, NICOLAS JM, GARCIA RAMALLO E, TOBIAS E, TITOS E, REY MJ, CLARIA J, ARROYO V, RODES J. Atrial natriuretic peptide antagonizes endothelin-induced calcium increase and cell contraction in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; **30**: 501–509.
- [22] GREENWEL P, IRABURU MJ, REYES ROMERO M, MERAZ CRUZ N, CASADO E, SOLIS HERRUZO JA, ROJKIND M. Induction of an acute phase response in rats stimulates the expression of $\alpha 1(I)$ procollagen messenger ribonucleic acid in their livers. Possible role of interleukin-6. *Lab Invest* 1995; **72**: 83–91.
- [23] GRESSNER AM, LOTFI S, GRESSNER G, HALTNER E, KROPF J. Synergism between hepatocytes and Kupffer cells in the activation of fat storing cells (perisinusoidal lipocytes). *J Hepatol* 1993; **19**: 117–132.
- [24] GRESSNER AM. The cell biology of liver fibrogenesis – an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998; **292**: 447–452.

- [25] HELLEMANS K, GRINKO I, ROMBOUITS K, SCHUPPAN D, GEERTS A. All-trans and 9-cis retinoic acid alter rat hepatic stellate cell phenotype differentially. *Gut* 1999; **45**: 134–142.
- [26] HELLERBRAND C, STEFANOVIC B, GIORDANO F, ELMAR R, BURCHARDT ER, BRENNER DA. The role of TGF β 1 in initiating hepatic stellate cell activation *in vivo*. *J Hepatol* 1999; **30**: 77–87.
- [27] HERNANDEZ-MUNOZ I, DE LA TORRE P, SANCHEZ-ALCAZAR JA, GARCIA I, SANTIAGO E, MUNOZ-YAGUE MT, SOLIS-HERRUZO JA. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G protein. *Gastroenterology* 1997; **113**: 625–640.
- [28] IKEDA H, YATOMI Y, YANASE M, SATOH H, MAEKAWA H, OGATA I, OZAKI Y, TAKUWA Y, MOCHIDA S, FUJIWARA K. Biological activities of novel lipid mediator sphingosine 1-phosphate in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 2000; **279**: G304–G310.
- [29] IRABURU MJ, DOMINGUEZ-ROSALES JA, FONTANA L, AUSTER A, GARCIA-TREVIJANO ER, COVARRUBIAS-PINEDO A, RIVAS-ESTILLA AM, GREENWEL P, ROJKIND M. Tumor necrosis factor- α down-regulates expression of the α 1(I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBP β - and C/EBP δ -dependent mechanism. *Hepatology* 2000; **31**: 1086–1093.
- [30] IREDALE JP, BENYON RC, PICKERING J, MCCULLEN M, NORTHROP M, PAWLEY S, HOVELL C, ARTHUR MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; **102**: 538–549.
- [31] ISSA R, WILLIAMS E, TRIM N, KENDALL T, ARTHUR MJP, REICHEN J, BENYON RC, IREDALE JR. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; **48**: 548–557.
- [32] IWAMOTO H, NAKAMUTA M, TADA S, SUGIMOTO R, ENJOJI M, NAWATA H. A p160ROCK-specific inhibitor, Y-27632, attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Hepatol* 2000; **32**: 762–770.
- [33] JARNAGIN WR, ROCKEY DC, KOTELIANSKY VE, WANG SS, BISSELL DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994; **127**: 2037–2048.
- [34] JOHNSON SJ, HINES JE, BURT AD. Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. *J Pathol* 1992; **166**: 351–358.
- [35] KAWADA N, SEKI S, KUROKI T, INOUE M. Regulation of stellate cell proliferation by lipopolysaccharide: role of endogenous nitric oxide. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; **13** Suppl: S6–S13.
- [36] KAWADA N, IKEDA K, SEKI S, KUROKI T. Expression of cyclins D1, D2 and E correlates with proliferation of rat stellate cells in culture. *J Hepatology* 1999; **30**: 1057–1064.
- [37] KMIEĆ Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; **161**: 1–151.
- [38] KMIEĆ Z. Rola komórek gwiaździstych (perisinusoidalnych) w regulacji funkcji wątroby. I. Morfologia i właściwości komórek gwiaździstych *in situ* oraz w hodowli komórkowej. *Post Biol Kom* 2003; **47**: 47–59.
- [39] KNITTEL T, MULLER L, SAILE B, RAMADORI G. Effect of tumour necrosis factor- α on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1997; **27**: 1067–1080.
- [40] KNOLLE PA, LOSER E, PROTZER U, DUCHMANN R, SCHMITT E, ZUM BUSCHENFELDE KH, ROSE JOHN S, GERKEN G. Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clin Exp Immunol* 1997; **107**: 555–561.
- [41] LEE KS, BUCK M, HOUGLUM K, CHOJKIER M. Activation of hepatic stellate cells by TGF- α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2461–2468.
- [42] LEVY MT, MCCAUGHAN GW, ABBOTT CA, PARK JE, CUNNINGHAM AM, MULLER E, RETTIG WJ, GORRELL MD. Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* 1999; **29**: 1768–1778.
- [43] MALLAT A, PREAUX AM, BLAZEJEWSKI S, ROSENBAUM J, DHUMEAUX D, MAVIER P. Interferon α and γ inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. *Hepatology* 1995; **21**: 1003–1010.
- [44] MALLAT A, PREAUX AM, SERRADEIL LE GAL C, RAUFASTE D, GALLOIS C, BRENNER DA, BRADHAM C, MACLOUF J, IOURGENKO V, FOUASSIER L, DHUMEAUX D, MAVIER P, LOTERSZTAJN S. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2771–2778.
- [45] MALLAT A, GALLOIS C, TAO J, HABIB A, MACLOUF J, MAVIER P, PREAUX AM, LOTERSZTAJN S. Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem* 1998; **273**: 27300–27305

- [46] MARRA F, GRANDALIANO G, VALENTE AJ, ABOUD HE. Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology* 1995; **22**: 780–787.
- [47] MARRA F, PASTACALDI S, ROMANELLI RG, PINZANI M, TICALI P, CARLONI V, LAFFI G, GENTILINI P. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998; **152**: 423–430.
- [48] MARRA F, ROMANELLI RG, GIANNINI C, FAILLI P, PASTACALDI S, ARRIGHI MC, PINZANI M, LAFFI G, MONTALTO P, GENTILINI P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; **29**: 140–148.
- [49] MATSUDA Y, MATSUMOTO K, YAMADA A, ICHIDA T, ASAKURA H, KOMORIYA Y, NISHIYAMA E, NAKAMURA T. Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* 1997; **26**: 81–89.
- [50] MURPHY FR, ISSA R, ZHOU X, RATNARAJAH S, NAGASE H, ARTHURMJ, BENYON C, IREDALE JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition. Implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 11069–11076.
- [51] NAPOLI J, BISHOP GA, MCGUINNESS PH, PAINTER DM, MCCAUGHAN GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; **24**: 759–765.
- [52] NELSON DR, LAUWERS GY, LAU JY, DAVIS GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; **118**: 655–660.
- [53] NIETO N, FRIEDMAN SL, CEDERBAUM AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrom P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002; **35**: 62–73.
- [54] OKUNO M, AKITA K, MORIWAKI H, KAWADA N, IKEDA K, KANEDA K, SUZUKI Y, KOJIMA S. Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- β . *Gastroenterology* 2001; **120**: 1784–1800.
- [55] OKUNO M, SATO T, KITAMOTO T, IMAI S, KAWADA N, SUZUKI Y, YOSHIMURA H, MORIWA-KI H, ONUKI K, MASUSHIGE S, MUTO Y, FRIEDMAN SL, KATO S, KOJIMA S. Increased 9,13-dicis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- β mediated fibrogenesis *in vivo*. *J Hepatol* 1999; **30**: 1073–1080.
- [56] OZAKI I, ZHAO G, MIZUTA T, OGAWA Y, HARA T, KAJIHARA S, HISATOMI A, SAKAI T, YAMAMOTO K. Hepatocyte growth factor induces collagenase (matrix metalloproteinase-1) via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line. *J Hepatol* 2002; **36**: 169–178.
- [57] PINZANI M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 2000; **21**: 475–490.
- [58] REEVES HL, THOMPSON MG, DACK CL, BURT AD, DAY CP. The role of phosphatidic acid in platelet-derived growth factor-induced proliferation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; **31**: 95–100.
- [59] ROSENBAUM J, BLAZEJEWSKI S. Regulation of Ito cell proliferation by soluble factors. *J Hepatol* 1995; **22** (2 Suppl): 65–70
- [60] SAILE B, KNITTEL T, MATTHES N, SCHOTT P, RAMADORI G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1265–1272.
- [61] SAILE B, MATTHES N, KNITTEL T, RAMADORI G. Transforming growth factor β and tumor necrosis factor α inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; **30**: 196–202 .
- [62] SAKAIDA I, NAGATOMI A, HIRONAKA K, UCHIDA K, OKITA K. Quantitative analysis of liver fibrosis and stellate cell changes in patients with chronic hepatitis C after interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**: 489–496.
- [63] SANDERSON N, FACTOR V, NAGY P, KOPP J, KONDAIAH P, WAKEFIELD L, ROBERTS AB, SPORN MB, THORGEIRSSON SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor β 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2572–2576.
- [64] SCHUFTAN GG, BACHEM MG. α 2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 1999; **29**: 519–528.
- [65] SCHUPPAN D, RUEHL M, SOMASUNDARAM R, HAHN EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; **21**: 351–372

- [66] SHAO R, YAN W, ROCKEY DC. Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing. *J Biol Chem* 1999; **274**: 3228–3234.
- [67] SIME PJ, O'REILLY KMA. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 2001; **99**: 308–319.
- [68] SOHARA N, TROJANOWSKA M, REUBEN A. Oncostatin M stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via a MEK-sensitive mechanism in human myofibroblasts. *J Hepatol* 2002; **36**: 191–199.
- [69] SPRENGER H, KAUFMANN A, GARN H, LAHME B, GEMSA D, GRESSNER AM. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; **113**: 277–285.
- [70] SPRENGER H, KAUFMANN A, GARN H, LAHME B, GEMSA D, GRESSNER AM. Differential expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999; **30**: 88–94.
- [71] SVEGLIATI-BARONI G, RIDOLFI F, DI-SARIO A, CASINI A, MARUCCIL, GAGGIOTTI G, ORLANDONI P, MACARRI G, PEREGO L, BENEDETTI A, FOLLI F. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 1999; **29**: 1743–1751.
- [72] THERET N, MUSSO O, L'HELGOUALC'H A, CLEMENT B. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; **150**: 51–58.
- [73] THOMPSON KC, TROWERN A, FOWELL A, MARATHE M, HAYCOCK C, ARTHUR MJ, SHERON N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *in vitro*. *Hepatology* 1998; **28**: 1518–1524.
- [74] UENO H, SAKAMOTO T, NAKAMURA T, QI Z, ASTUCHI N, TAKESHITA A, SHIMIZU K, OHASHI H. A soluble transforming growth factor β receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 33–42.
- [75] WANG SC, OHATA M, SCHRUM L, RIPPE RA, TSUKAMOTO H. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 302–308.
- [76] WILLIAMS EJ, BENYON RC, TRIM N, HADWIN R, GROVE BH, ARTHUR MJ, UNEMORI EN, IREDALE JP. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis *in vivo*. *Gut* 2001; **49**: 577–583.
- [77] XU Y, ROJKIND M, CZAJA MJ. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1870–1877.
- [78] ZHU J, WU J, FRIZELL E, LIU S-L, BASHEY R, RUBIN R, NORTOM P, ZERN MA. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation *in vitro* and limits fibrogenesis in an *in vivo* model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 1999; **117**: 1198–1204.
- [79] ZIMMERMANN A, ZHAO D, REICHEN J. Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. *J Hepatol* 1999; **30**: 646–652.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 23.05.2002 r.

Przyjęto: 08.07.2002 r.

Katedra Histologii i Immunologii AM

ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

E-mail: zkmiec@amg.gda.pl

WYCISZANIE RNA; NATURALNY SYSTEM OBRONNY ROŚLIN PRZECIW INFEKCYJ WIRUSOWEJ RNA SILENCING AS A PLANT INNATE SYSTEM AGAINST VIRAL INFECTION

Przemysław LEHMANN

Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

Streszczenie: Wyciszanie RNA jest procesem, w którym dochodzi do degradacji w komórkach roślin (oraz innych organizmów) wybranych cząsteczek RNA. Mechanizm ten odgrywa kluczową rolę w dwóch niezwykle ważnych dla roślin procesach: w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów i w obronie roślin przed infekcją wirusową. W identyfikacji właściwych do degradacji cząsteczek RNA biorą udział krótkie fragmenty RNA o długości 21–25 nukleotydów oraz roślinna rybonukleaza. Sygnał uruchamiający wyciszanie RNA w całej roślinie, a tym samym indukcję naturalnego systemu obronnego przeciw infekcji przez wirusy, jest rozprzestrzeniany w roślinie w odpowiedzi na infekcję wirusami. Dotąd nie wyjaśniono, co stanowi i w jaki sposób rozprzestrzenia się w roślinach taki sygnał. Niektóre wirusy przystosowały ewolucyjnie swoje białka do blokowania wybranych etapów wyciszania RNA, uniemożliwiając w ten sposób normalny przebieg reakcji obronnej rośliny na atak wirusa. Opisany system przypomina pod pewnymi względami system immunologiczny ssaków.

Słowa kluczowe: odporność na wirusy, wyciszanie RNA, interferencja RNA, krzyżowa ochrona, kosupresja, potranskrypcyjne wyciszanie genów.

Summary: RNA silencing is a newly discovered mechanism of gene regulation and defence against viruses. The mechanism is based on sequence-specific targeting and degradation of RNA. It appears to be directed by double-stranded RNA, associated with the production of short 21 to 25 nt RNAs, and spread through the plant by a mobile signal. It is not known what is the signal. Many of plant viruses encode suppressors of RNA silencing, which inhibits of an antiviral defence system in plants. RNA silencing is conceptually similar to classical humoral immunity.

Key words: viral resistance, RNA silencing, RNA interference, cross protection, post-transcriptional gene silencing, co-suppression.

WPROWADZENIE

Krzyżowa ochrona (ang. *cross protection*) była szeroko obserwowana u roślin od wielu lat. Zjawisko to polega na tym, że roślina zakażona szczepem określonego wirusa nie ulega zakażeniu przez inny szczep tego wirusa lub przez wirus blisko spokrewniony [44]. W 1985 roku Sanford i Johnston przedstawili koncepcję nawiązującą do zjawiska *cross protection*, która miała umożliwić w drodze transformacji komórek roślinnych genami wirusa, wywołanie w roślinach transgenicznych odporności na infekcję przez wirusy [51]. Zgodnie z zaproponowanym przez autorów podejściem udało się wywołać w roślinach odporność, nazwaną od źródła transgenu użytego podczas transformacji, odpornością pochodzącą od patogena (ang. *pathogen-derived resistance*; PDR). Od pierwszych doniesień na temat transformacji roślin genami wirusowymi minęło 15 lat [46]. W tym okresie przeprowadzono transformację wielu gatunków roślin całymi genami (lub fragmentami genów) wirusów, obserwując pojawianie się w roślinach transgenicznych odporności na wirusy (prace przeglądowe [3, 5, 37, 64]). Indukowana w transgenicznych roślinach odporność charakteryzowała się zróżnicowanym poziomem, który był zależny od zastosowanego podczas transformacji genu wirusowego, a niezależny od sposobu transformacji. Ilość kopii transgenu wprowadzona do genomu roślin również nie miała zwykle wpływu na poziom odporności. Odporność PDR była specyficzna w stosunku do wirusa, z którego pochodził transgen. Obserwowana odporność działała na poziomie pojedynczej komórki, ale zanotowano również liczne przypadki, kiedy dochodziło do hamowania systemicznego rozprzestrzeniania się wirusa. Wykazano dla kilku wirusów korelację między poziomem ekspresji białka wirusa w roślinach transgenicznych a poziomem odporności [37]. Najbardziej wszechstronne badania tych zależności przeprowadzono na tytoniu i wirusie TMV [6, 50]. Obecność białka wirusowego transgenu nie zawsze była warunkiem indukcji odporności. Najbardziej przekonujące dane na ten temat pochodziły z doświadczeń przeprowadzonych na tytoniu i wirusie TEV [22, 52]. Linie transgeniczne tytoniu, w których komórkach dochodziło do syntezy białka płaszczka wirusa TEV lub fragmentu tego białka, wykazywały niski poziom odporności lub jej brak. Wysoki poziom odporności na infekcję wirusa TEV obserwowano natomiast w tych liniach transgenicznych, w których syntetyzowany był nieulegający translacji RNA kodujący białko płaszczka. Te sprzeczne z poprzednimi wynikami (o udziale białka płaszczka wirusa w uruchamianiu mechanizmu odporności) obserwacje doprowadziły do wniosku, że mogą istnieć dwa niezależne mechanizmy omawianej odporności. Mechanizm związany z obecnością w komórkach roślinnych białka, najczęściej białka płaszczka wirusa (ang. *coat protein-mediated resistance*; CP-MR) i mechanizm związany z obecnością RNA (ang. *RNA-mediated virus resistance*; RM-VR lub *homology-dependent resistance*; HDR). Pierwszy mechanizm leży u podłoża (związanej z białkiem) odporności, która charakteryzuje się zwykle stosunkowo niskim poziomem, ale zabezpiecza roślinę również przed infekcją wirusami spokrewnionymi z wirusem, z którego pochodziło białko płaszczka. W przeciwieństwie do tego drugi mechanizm

odpowiada za powstawanie odporności o wysokim poziomie, ale skutecznej tylko w stosunku do jednego wirusa, a niekiedy tylko jednego szczepu wirusowego [37].

1. WYCISZANIE GENÓW

Zaskakującym odkryciem, jakiego dokonano podczas badań dotyczących funkcji genów roślinnych oraz modyfikacji roślin użytkowych, w których wykorzystywano transformację, było zjawisko kosupresji genów (ang. *co-suppression*). Kosupresja genów przejawia się równoczesnym zahamowaniem ekspresji transgenu i homologicznego do niego endogennego genu roślinnego. Mówimy wtedy, że gen zostaje wyciszony (ang. *gene silencing*). Pierwsze doniesienie na ten temat u roślin było związane z transformacją petunii genem syntazy chalkonowej [41]. Wprowadzenie tego genu spowodowało w roślinie zanik czerwonej barwy kwiatu. W ciągu ostatnich kilku lat opublikowano wiele doniesień związanych z tym zjawiskiem. Doświadczenia objęły różne transgeny i różne gatunki roślin [28]. Obserwowane wyciszanie genów u roślin może się ujawnić albo przez represję transkrypcji i jest wtedy określane jako transkrypcyjne wyciszanie genów (ang. *transcriptional gene silencing*, TGS), albo przez degradację mRNA i jest wtedy określane jako potranskrypcyjne wyciszanie genów (ang. *post-transcriptional gene silencing*, PTGS). Zjawisko wyciszania genów (TGS i PTGS) nie powstało z pewnością jako reakcja na zabiegi transformacyjne we współczesnej inżynierii genetycznej. Są to elementy naturalnego systemu związanego z jednej strony z regulacją ekspresji genów, z drugiej z zabezpieczeniem przed możliwością wtargnięcia do komórki roślinnej szkodliwych dla niej intruzów, takich jak wirusy czy elementy DNA zdolne do transpozycji (ang. *transposable elements*, TE). Kiedy taki obcy lub zdolny do przemieszczania się materiał genetyczny (DNA lub RNA) pojawi się w komórce gospodarza, to w przypadku, kiedy istniejący system obronny będzie sprawny, najprawdopodobniej zostanie przez niego wykryty i jako szkodliwy dla komórki roślinnej wyeliminowany.

1.1. Transkrypcyjne wyciszanie genów (TGS)

Transkrypcyjne wyciszanie genów jest z reguły związane z metylacją promotora i zmianami w jego strukturze [8]. Choć większość wyciszonych w ten sposób transgenów występuje w genomie roślinnym w wielu kopiach, transgeny występujące w pojedynczych kopiach mogą być również wyciszane tym samym sposobem. Nieczynny w wyniku metylacji promotor jest czasami przenoszony z pokolenia na pokolenie. Równocześnie proces deacetylacji histonów, stymulujący przekształcanie się euchromatyny w heterochromatynę, powoduje, że aktywność promotorów nie może się ujawnić [9, 65]. Ostatnie doniesienia wskazują, że TGS podobnie jak PTGS może być również uruchamiany przez dsRNA czy wirusy, bez równoczesnej metylacji wyciszanych genów [58].

1.2. Potranskrypcyjne wyciszanie genów (PTGS)

Potranskrypcyjne wyciszenie genów badano głównie u roślin [57]. U grzyba (*Neurospora crassa*) zbliżone zjawisko określane jest terminem „tłumienie” (ang. *quelling*) i było również przedmiotem intensywnych badań [13]. Podobne obserwacje pochodziły z badań u *Drosophila melanogaster*. W tym przypadku określano je jako „interferencja RNA” (ang. *RNA interference*) [32]. Istnieją liczne dane wskazujące, że PTGS ma kluczowe cechy zarówno odporności na wirusy związanej z RNA (ang. *RNA-mediated virus resistance*; RMVR) u roślin [66], jak i zjawiska tzw. „interferencji RNA” u *Drosophila* czy „tłumienia” u grzybów [13, 28, 55]. Ponieważ brak ekspresji genów w każdym z tych przypadków był spowodowany degradacją wybranego RNA, zaproponowane przez Baulcombe określenie „wyciszanie RNA” (ang. *RNA silencing*) w odniesieniu do wszystkich tych zjawisk wydaje się odpowiadać najlepiej ich istocie [4]. Wyniki prac grupy Dougherty z lat 1992–1995 przeprowadzonych na tytoniu i wirusie TEV były źródłem danych wskazujących na związki pomiędzy wyciszaniem RNA i odpornością na wirusy u roślin. Autorzy ci wykazali, że infekcja transgenicznych linii tytoniu wirusem TEV, może uruchomić w roślinach proces wyciszania RNA pochodzącego z transgenów wirusowych. Aktywacja wyciszania RNA była połączona z „ozdrowieniem” roślin tytoniu z pierwotnej infekcji. Liście, które wyrastały powyżej miejsca tej pierwotnej inokulacji, nie wykazywały obecności wirusa i systemicznych objawów choroby wirusowej. Rośliny ujawniały ponadto nabytą tą drogą odporność na ponowną infekcję tym samym wirusem, który został użyty podczas pierwotnej inokulacji [35].

Wspomniana we Wprowadzeniu do tej pracy krzyżowa ochrona roślin (ang. *cross protection*) będąca wynikiem ich wcześniejszej inokulacji łagodnym szczepem wirusa wykazuje podobieństwo do zjawiska „ozdrowienia” roślin podczas indukcji odporności na wirusy związanej z RNA (RMVR) [16, 48]. Ratcliff i wsp. wykazali, że „ozdrowienie” roślin *Nicotiana benthamiana* przez inokulację tobrawirusami było również związane z aktywnością RMVR w „ozdrowionych” liściach, a mechanizm odporności był prawdopodobnie identyczny z mechanizmem PTGS [49]. Wyniki powyższych badań wskazują, że infekcja wirusowa roślin nietransgenicznych uruchamia mechanizm wyciszania RNA skierowany przeciw wirusowemu RNA i potwierdza w ten sposób wcześniejsze odkrycia, że indukcja wyciszania RNA nie wymaga obecności homologicznych, jądrowych sekwencji DNA [16, 48, 49]. Zaprezentowane w niniejszej pracy w dużym skrócie wyniki badań pozwoliły na stwierdzenie istnienia u roślin naturalnego systemu obronnego przed infekcją wirusową wykorzystującego mechanizm wyciszania RNA. Wiele szczegółów należy jeszcze wyjaśnić, ale zebrane dotąd informacje pozwalają na zarysowanie molekularnych podstaw tego systemu.

2. MECHANIZM WYCISZANIA RNA

2.1. Rozpoznanie infekującego wirusa i włączenie systemu degradującego RNA

Jak wspomniano powyżej, transformacja roślin genem wirusowym indukowała odporność na wirusy nawet wtedy, gdy w komórkach roślinnych nie dochodziło do syntezy białek wirusowych, a jedynie RNA [35]. Zarówno w tym przypadku, jak i wtedy, gdy obserwowano kosupresję genów u petunii [41], dochodziło w jądrze do normalnej ekspresji transgenów, natomiast poziom ich produktów w cytoplazmie był bardzo niski. To sugerowało, że gdy w cytoplazmie komórek roślinnych pojawia się mRNA transgenu i zostaje oceniony przez system kontrolny tych komórek jako zbędny, to dochodzi do jego degradacji [23]. W komórkach roślin transformowanych genami wirusowymi, obok mRNA transgenów wirusowych, degradowane było równocześnie RNA wirusa, który infekował rośliny. Dochodziło do tego tylko wtedy, gdy infekujący wirus miał sekwencje homologiczne z sekwencjami transgenu. Wirusy roślinne były więc celem wyciszenia RNA indukowanego przez wirusowy transgen. Jak już wspomniano poprzednio, zupełnie niezależnie wykazano, że wirusy roślinne mogą indukować wyciszenie RNA u roślin nietransformowanych [48, 49].

Przedstawiono dotąd kilka koncepcji na temat mechanizmu uruchamiania w komórkach roślinnych systemu degradacji RNA. Najwcześniej pojawiła się propozycja grupy Dougherty [54]. Model ten zakładał, że mRNA transgenu i RNA wirusowy, mające wspólne homologiczne sekwencje, po przekroczeniu określonego poziomu progowego powodują aktywację komórkowego systemu specyficznej degradacji tego RNA [54]. Kolejny model zakładał udział „zniekształconego” RNA (ang. *aberrant RNA*) w indukowaniu w komórkach roślinnych systemu degradacji RNA. Ten „zniekształcony” RNA mógłby powstawać w komórkach roślinnych w wyniku zakłócenia transkrypcji, na przykład przez zmetylowanie transgenu [25, 60]. W licznych doświadczeniach wykazano, że wyciszenie RNA było indukowane w roślinach z dużą wydajnością przez specjalnie zaprojektowane transgeny zdolne do ekspresji RNA tworzącego spontanicznie, komplementarne dupleksy (dsRNA) [61, 62]. Badania dowiodły również, że podczas zachodzącej replikacji cząsteczki RNA wirusów roślinnych dochodzi do wytworzenia w cytoplazmie pośrednich dwuniciowych form RNA wirusowego. Formy takie były zdolne do indukcji wyciszenia RNA. Ten rodzaj wyciszenia RNA został określony jako wyciszenie genów indukowane działaniem wirusa (ang. *virus-induced gene silencing*, VIGS). Wynika stąd, że dwuniciowy RNA pełni rolę induktora systemu specyficznej degradacji RNA. To prowadzi w konsekwencji do ochrony roślin przed infekcją wirusową, co jest realizowane przez specyficzną degradację RNA infekującego wirusa.

2.2. Tworzenie fragmentów siRNA

Jak wspomniano powyżej, istnieją dwie drogi wytwarzania dsRNA prowadzące do indukcji wyciszania RNA w cytoplazmie. Pierwsza polega na indukcji wyciszania RNA podczas infekcji wirusów z udziałem wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRP). Druga droga jest związana z ekspresją transgenów. W tym przypadku bierze udział roślinna polimeraza RNA zależna od RNA. Dwuniciowy RNA pochodzący albo od wirusa, albo z transgeny był trawiony w obecności ATP przez rybonukleazę – DICER (nazwa RNazy Dicer wywodzi się z systemu *Drosophila*). Rybonukleaza Dicer jest homologiem RNazy III *E. coli* i ma trzy funkcjonalne domeny: wiążącą dsRNA, RNA helikazową i domenę PAZ [24]. Rybonukleaza Dicer jest unikalnym enzymem w grupie RNazy III ze względu na wymaganie ATP, co wiąże się z obecnością domeny RNA helikazowej na N-końcu białka [7, 42]. Domena helikazowa może służyć do lokalnego rozwijania dsRNA, pozwalając w ten sposób na jego cięcie, ale to wydaje się mało prawdopodobne, jako że inne RNazy III nie wymagają takiej funkcji helikazowej. Bardziej prawdopodobne jest to, że domena helikazowa może być translokazą RNA służącą w obecności ATP do przeciągania RNazy Dicer wzdłuż dsRNA. Inny dowód wskazuje, że wiązanie RNazy Dicer do RNA i aktywność katalityczna może być także regulowana przez ATP [30]. Powstające w wyniku trawienia dwuniciowego RNA, krótkie (21–25 nt) fragmenty siRNA (ang. *small interfering RNA*) są zdolne do hybrydyzacji zarówno z nicią sensowną, jak i antysensowną RNA [7, 29]. Fragmenty siRNA znajdujące się w komórkach roślinnych wykazujących: kosupresję genów, wyciszanie genów związane z obecnością wirusów (VIGS) czy odporność na wirusy [17, 29, 36, 39]. Obecność tych fragmentów RNA w komórkach roślinnych, w których dochodzi do aktywacji wspomnianych powyżej procesów, sugerowało, że może istnieć wspólny molekularny mechanizm tych zjawisk.

2.3. Rola fragmentów siRNA w degradacji RNA

Fragmenty siRNA wytwarzane przez rybonukleazę Dicer kierują kompleks RISC (ang. *RNA Interference Specificity Complex*) do wybranego RNA, który ma być zdegradowany. Chociaż jak dotąd nie zidentyfikowano większości jego białkowych składników, to przypuszcza się, że kompleks RISC obejmuje następujące enzymy: endonukleazę, egzonukleazę, helikazę i enzym mający zdolność wyszukiwania homologii w łańcuchu RNA [45]. Składnikiem kompleksu RISC jest również białko z rodziny PAZ/Piwi, które współdziała z RNazą DICER przez domenę PAZ [12] w dołączaniu fragmentów siRNA do białkowej części kompleksu RISC. Rybonukleaza z kompleksu RISC nie została jeszcze w pełni zidentyfikowana, ale kilka obserwacji dowodzi, że jest to inny enzym niż rybonukleaza Dicer. RNaza ta może być chromatograficznie oddzielona od enzymu z kompleksu RISC [7]. Enzym działający w kompleksie RISC jest niezależny od ATP w przeciwieństwie do rybonukleazy Dicer [42]. Prawdopodobnie kompleks degradacyjny (RISC) działa na powierzchni jądra komórkowego lub w plazmodesmach, kontrolując przechodzące z jądra do cytoplazmy lub między komórkami cząsteczki RNA. Taka lokalizacja kompleksów RISC umożliwiłaby szybką selekcję

i degradację cząsteczek RNA, które uzna za właściwe, tzn. mające homologię do fragmentów siRNA. Wirusowy RNA byłby rozpoznawany i degradowany podczas przenoszenia się z komórki do komórki przez plazmodesmy.

2.4. Rozprzestrzenianie się wyciszania RNA w roślinie

Wyciszanie RNA w roślinach może być indukowane lokalnie, a następnie może się rozprzestrzeniać w całej roślinie [43, 59]. Ta zdolność rozprzestrzeniania się procesu wyciszania RNA w całej roślinie potwierdza udział tego procesu jako jednego z mechanizmów powstawania odporności na wirusy u roślin. Wirusy przenikają do komórek roślinnych, gdzie dochodzi do replikacji wirusowego RNA. W następnym etapie wirus przemieszcza się z komórki do komórki przez plazmodesmy. Ruch wirusa pomiędzy komórkami trwa tak długo, aż dotrze on do wiązek przewodzących, które pozwalają mu na swobodne rozprzestrzenienie się we wszystkich częściach rośliny. Równoległe do rozprzestrzeniania się wirusa w roślinie zachodzi przemieszczanie się mobilnego sygnału indukującego proces wyciszania RNA. Jest to pewnego rodzaju wyścig. Jeżeli wirus rozprzestrzenia się szybciej niż mobilny sygnał wyciszania, to dochodzi do systemicznej infekcji rośliny. W sytuacji odwrotnej infekcja zostanie skutecznie zahamowana. Wtedy wirus dociera do komórek, w których proces wyciszania RNA został już wcześniej uruchomiony. Sam mechanizm rozprzestrzeniania się zjawiska wyciszania RNA w roślinach jest bardzo słabo poznany. Równie niejasna wydaje się być sprawa z określeniem cząsteczki, która mogłaby pełnić rolę sygnału wyciszania RNA. Wiele wskazuje na to, że nie jest nim siRNA, ale raczej rolę tę może pełnić dsRNA.

2.5. Udział genów roślinnych w procesie wyciszania RNA

Kilka genów związanych z procesem wyciszania RNA zostało zidentyfikowanych podczas analizy mutantów *Arabidopsis* niezdolnych do indukcji wyciszania RNA. Geny te kodują najprawdopodobniej następujące białka: zależną od RNA polimerazę RNA (gen *sgs2* [40] lub gen *sde1* [17]), faktory inicjacji translacji zawierające domeny PAZ i Piwi (gen *ago1* [26]) i helikazę RNA (gen *sde3* [18]). Dotychczas został zidentyfikowany u *Arabidopsis* tylko jeden gen – *sgs3*, kodujący białko, którego funkcja nie została dotąd poznana i wydaje się być unikalny dla roślin [40]. Geny kodujące białka pokrewne do wymienionych powyżej zostały także zidentyfikowane u *Caenorhabditis elegans* i *Neurospora crassa* [11, 14, 15, 21, 34, 53]. Dalsze badania mutantów *Arabidopsis thaliana* wykazały, że zmiany struktury DNA są niezbędne, aby doszło do indukcji wyciszania RNA przez transgeny. Analiza mutantów *ddm1* i *met1* *Arabidopsis* ujawniła ich niezdolność do indukcji (*ddm1*) i utrzymania wyciszania transgeny GUS (*met1*). Wykazano, że zidentyfikowany w ten sposób gen *ddm1* koduje zmutowany czynnik białkowy, który nie jest zdolny do zmiany struktury chromatyny. Natomiast gen *met1* koduje zmutowaną metylotransferazę pozbawioną zdolności metylacji DNA [27, 31]. Badania mutantów *Arabidopsis* wskazują, że do wyciszania RNA u roślin (ale nie tylko u roślin) nie wystarcza jedynie obecność aktywnych kompleksów DICER i RISC, ale wymagane jest również spełnienie innych warunków,

takich jak: dostępność aparatu translacji (*ago1*), polimerazy RNA zależnej od RNA (*sgs2*), jak również poprawnej interakcji kompleksów DICER i RISC z roślinnym DNA (*ddm1* i *met1*).

2.6. Supresja wyciszania RNA

Niektóre grupy wirusów roślinnych kodują białka, które całkowicie lub częściowo hamują wyciszanie RNA. Dochodzi w ten sposób do wyłączenia naturalnego systemu obronnego przeciw infekcji wirusami opartego na wyciszaniu RNA. Do najbardziej znanych wirusowych supresorów wyciszania RNA u roślin należą: proteinaza kodowana przez gen *HC-Pro* u potywirusów [1, 10, 33], białko 2b kodowane przez gen *cmv2b* wirusa mozaiki ogórka (CMV) [10] i białko przemieszczania się wirusów z komórki do komórki wirusa PVX kodowane przez gen *p25*. Każde z tych białek wirusowych blokuje inny etap procesu wyciszania RNA. Najważniejszym objawem hamowania wyciszania RNA przez proteinazę HC-Pro jest brak w komórkach roślinnych fragmentów siRNA [36]. Białko HC-Pro nie hamuje wytwarzania sygnałów wyciszania [38]. To by wskazywało, że białko HC-Pro działa w szlaku prowadzącym do wyciszania RNA na etapie wytwarzania siRNA, ale nie ma wpływu na wytwarzanie sygnałów wyciszania RNA. Białko HC-Pro powoduje w roślinach wzrost poziomu wirusów pokrewnych (nie potywirusów), co może tłumaczyć występowanie dużej liczby chorób synergistycznych u roślin, spowodowanych obecnością obok potywirusów również innych wirusów, np. PVX [47, 56]. Za pomocą drożdżowego systemu do badania interakcji białko-białko (*yeast two-hybrid system*) udało się zidentyfikować w roślinach tytoniu białko rgs-CaM, podobne do kalmoduliny, które wchodzi w interakcję z proteinazą HC-Pro [2]. Kompleks białek: HC-Pro i rgs-CaM hamuje wyciszanie RNA. Białko rgs-CaM może więc pełnić u roślin rolę pośrednika w procesie wyłączenia wyciszania przez białko HC-Pro. Białko p25 wirusa PVX jest znacznie słabszym niż proteinaza HC-Pro supresorem wyciszania RNA [60]. Wirusowe białko p25 hamuje wytwarzanie i wysyłanie systemicznych sygnałów wyciszania RNA zarówno indukowanych przez transgen, jak i przez wirusowe RNA. Białko 2b kodowane przez gen *cmv2b* wirusa mozaiki ogórka zostało zidentyfikowane jako supresor wyciszania RNA u *Nicotiana benthamiana* [10]. O tym, że białko 2b funkcjonuje jako supresor obrony roślin przed wirusami, wiadano od 1995 roku, kiedy stwierdzono, że białko *cmv2b* jest istotne dla ujawnienia się symptomów chorobowych [20]. Poprzednie badania także wskazywały, że gen *cmv2b* należy do genów, które powstały ewolucyjnie później niż pozostałe geny tego wirusa [19, 20]. To wskazywało, że gen *cmv2b* mógłby pojawić się jako wynik wirusowej adaptacji do powstałego u roślin systemu obronnego przed infekcją wirusową przez wyciszanie RNA.

PODSUMOWANIE

W ostatnich kilku latach nastąpił wyraźny postęp, jeżeli chodzi o zrozumienie roli i mechanizmu wyciszania RNA. Wyniki badań u roślin, grzybów czy zwierząt wskazują, że mechanizm wyciszania RNA może być bardzo zbliżony we wszystkich tych tak odległych genetycznie organizmach. Udowodniono, że u roślin wyciszanie RNA jest naturalnym systemem obrony przed infekcją wirusową, ale również może pełnić ważną rolę w regulacji ekspresji genów roślinnych. Propozycja, że wyciszanie RNA jest naturalnym systemem obronnym przeciw wirusom, wynika z następujących kluczowych obserwacji:

- (1) kilka grup wirusów roślinnych wykształciło wykorzystujący własne białka mechanizm, który jest w stanie zablokować proces wyciszania RNA umożliwiając w ten sposób normalny przebieg infekcji wirusowej,
- (2) zaobserwowano, że gdy rośliny, podatne na danego wirusa, osiągają w wyniku transformacji genem wirusowym stan tzw. „ozdrowienia”, są wtedy odporne na reinokulację tymi samymi wirusami lub wirusami pokrewnymi, ponieważ w roślinie działa już wyciszanie RNA,
- (3) inokulacja wirusem roślin nietransgenicznym może wywołać stan bardzo podobny do stanu tzw. „ozdrowienia”.

Dodatkowym argumentem za określaniem wyciszania RNA jako naturalnego systemu obronnego przed infekcją wirusową jest zdolność do rozprzestrzeniania się wyciszania RNA w całej roślinie z miejsca jego lokalnej indukcji. Prace badawcze dotyczące wyciszania RNA są aktualnie prowadzone w wielu laboratoriach i dotyczą oprócz roślin również kilku innych organizmów.

LITERATURA

- [1] ANANDALAKSHMI R, PRUSS GJ, GE X, MARATHE R, MALLORY AC, SMITH TH, VANCE VB. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13079–13084.
- [2] ANANDALAKSHMI R, MARATHE R, GE X, HERR JM, MAU C, MALLORY A, PRUSS G, BOWMAN L, VANCE VB. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 2000; **290**: 142–144.
- [3] BAULCOMBE DC. Novel strategies for engineering virus resistance in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 1994; **5**: 117–124.
- [4] BAULCOMBE DC. Gene silencing: RNA makes RNA makes no protein. *Curr Biol* 1999; **9**: R599–R601.
- [5] BEACHY RN, LOESCH-FRIES S, TUMER NE. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 1990; **28**: 451–474.
- [6] BEACHY RN. Coat-protein mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Phil Trans R Soc Lond B* 1999; **354**: 659–664.
- [7] BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; **409**: 363–366.
- [8] BESTOR TH, TYCKO B. Creation of genomic methylation pattern. *Nature Genet* 1996; **12**: 363–367.
- [9] BIRD AP, WOLFFE AP. Methylation-induced repression: belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; **99**: 451–454.

- [10] BRIGNETI G, VOINNET O, LI WX, JI LH, DING SW, BAULCOMBE DC. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 1998; **17**: 6739–6746.
- [11] CATALANOTTO C, AZZALIN G, MACINO G, COGONI C. Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 2000; **404**: 245.
- [12] CERUTTI L, MIAN N, BATEMAN A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 481–482.
- [13] COGONI C, MACINO G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr Opin Microbiol* 1999; **2**: 657–662.
- [14] COGONI C, MACINO G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 1999; **399**: 166–169.
- [15] COGONI C, MACINO G. Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 1999; **286**: 2342–2344.
- [16] COVEY SN, AL-KAFF ND, LANGARA A, TURNER DS. Plant combat infection by gene silencing. *Nature* 1997; **385**: 781–782.
- [17] DALMAY T, HAMILTON A, RUDD S, ANGELL S, BAULCOMBE DC. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000; **101**: 543–553.
- [18] DALMAY T, HORSEFIELD R, BRAUNSTEIN TH, BAULCOMBE DC. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2001; **20**: 2069–2077.
- [19] DING SW, ANDERSON BJ, HAASE RH, SYMONS RH. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* 1994; **198**: 593–601.
- [20] DING SW, LI WX, SYMONS RH. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J* 1995; **14**: 5762–5772.
- [21] DOMEIER ME, MORSE DP, KNIGHT SW, PORTEREIKO M, BASS BL, MANGO SE. A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2000; **289**: 1928–1930.
- [22] DOUGHERTY WG, LINDBO JA, SMITH HA, PARKS TD, SWANEY S, PROEBSTING WM. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant-Microbe Interact* 1994; **7**: 544–552.
- [23] DOUGHERTY WG, PARKS TD. Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 399–405.
- [24] ELBASHIR SM, LENDECKEL W, TUSCHL T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; **15**: 188–200.
- [25] ENGLISH JJ, MUELLER E, BAULCOMBE DC. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 1996; **8**: 787–797.
- [26] FAGARD M, BOUTET S, MOREL JB, BELLINI C, VAUCHERET H. AGO-1, ODE-2 and RDE-1 are related proteins required for PTGS in plants, quelling in fungi and RNAi in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11650–11654.
- [27] FINNEGAN EJ, PEACOCK WJ, DENNIS ES. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8449–8454.
- [28] FIRE A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 1999; **15**: 358–363.
- [29] HAMILTON AJ, BAULCOMBE DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999; **286**: 950–952.
- [30] HUTVAGNER G, MCLACHLAN J, PASQUINELLI AE, BALINT E, TUSCHL T, ZAMORE PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* 2001; **293**: 834–838.
- [31] JEDDELLOH JA, STOKES TL, RICHARDS EJ. Maintenance of genomic methylation re-quires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genet* 1999; **22**: 94–97.
- [32] JENSEN S, GASSAMA MP, HEIDMANN T. Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat Genet* 1999; **21**: 209–212.
- [33] KASSCHAU KD, CARRINGTON JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 1998; **95**: 461–470.
- [34] KETTING RF, HAVERKAMP TH, VAN LUENEN HG, PLASTERK RH. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 1999; **99**: 133–141.

- [35] LINDBO JA, SILVA-ROSALES L, PROEBSTING WM, DOUGHERTY WG. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 1993; **5**: 1749–1759.
- [36] LLAVE C, KASSCHAU KD, CARRINGTON JC. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13401–13406.
- [37] LOMONOSOFF GP. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 1995; **33**: 323–343.
- [38] MALLORY AC, ELY L, SMITH TH, MARATHE R, ANANDALAKSHMI R, FAGARD M, VAUCHERET H, PRUSS G, BOWMAN L, VANCE VB. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 2001; **13**: 571–583.
- [39] METTE MF, AUFATZ W, VAN DER WINDEN J, MATZKE MA, MATZKE AJM. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA. *EMBO J* 2000; **19**: 5194–5201.
- [40] MOURRAIN P, BECLIN C, ELMAYAN T, FEUERBACH F, GODON C, MOREL J-B, JOUETTE D, LACOMBE A-M, NIKIC S, PICAULT N i wsp. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000; **101**: 533–542.
- [41] NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene *in trans*. *Plant Cell* 1990; **2**: 279–289.
- [42] NYKÄNEN A, HALEY B, ZAMORE PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; **107**: 309–321.
- [43] PALAUQUI J-C, ELMAYAN T, POLLIN J-M, VAUCHERET H. Systemic acquired silencing: Transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 1997; **16**: 4738–4745.
- [44] PENNAZIO S, ROGGERO P, CONTI M. A history of plant virology. Cross protection. *Microbiologica* 2001; **24**: 99–114.
- [45] PLASTERK RHA, KETTING RF. The silence of the genes. *Curr Opin Genet Dev* 2000; **10**: 562–567.
- [46] POWELL-ABEL P, NELSON RS, DE B, HOFFMANN N, ROGERS SG, FRALEY RT, BEACHY RN. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 1986; **232**: 738–743.
- [47] PRUSS G, GE X, SHI XM, CARRINGTON JC, BOWMAN L, VANCE V. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 1997; **9**: 859–868.
- [48] RATCLIFF F, HARRISON BD, BAULCOMBE DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 1997; **276**: 1558–1560.
- [49] RATCLIFF FG, MACFARLANE SA, BAULCOMBE DC. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 1999; **11**: 1207–1216.
- [50] REIMANN-PHILIPP U, BEACHY RN. The mechanism(s) coat protein-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Semin Virol* 1993; **4**: 349–356.
- [51] SANFORD JC, JOHNSTON SA. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. *J Theor Biol* 1985; **115**: 395–405.
- [52] SILVA-ROSALES L, LINDBO JA, DOUGHERTY WG. Analysis of transgenic tobacco plants expressing a truncated form of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Plant Mol Biol* 1994; **24**: 929–939.
- [53] SMARDON A, SPOERKE J, STACEY S, KLEIN M, MACKIN N, MAINE, E. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 2000; **10**: 169–178.
- [54] SMITH HA, SWANEY SL, PARKS TD, WERNSMAN EA, DOUGHERTY WG. Transgenic plants virus resistance mediated by untranslated sense RNAs: expression, regulation and fate of non-essential RNAs. *Plant Cell* 1994; **6**: 1441–1453.
- [55] TUSCHL T, ZAMORE PD, LEHMANN R, BARTEL DP, SHARP PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev* 1999; **13**: 3191–3197.
- [56] VANCE VB, BERGER PH, CARRINGTON JC, HUNT AG, SHI XM. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 1995; **206**: 583–590.
- [57] VAUCHERET H, BECLIN C, ELMAYAN T, FEUERBACH F, GODON C, MOREL JB, MOURRAIN P, PALAUQUI JC, VERNHETTES S. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 1998; **16**: 651–659.
- [58] VAUCHERET H, FAGARD M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* 2001; **17**: 29–35.

- [59] VOINNET O, BAULCOMBE DC. Systemic signaling in gene silencing. *Nature* 1997; **389**: 553.
- [60] VOINNET O, VAIN P, ANGELL S, BAULCOMBE DC. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 1998; **95**: 177–187.
- [61] WANG MB, WATERHOUSE PM. High efficiency of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 67–82.
- [62] WATERHOUSE PM, GRAHAM MW, WANG MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13959–13964.
- [63] WATERHOUSE PM, SMITH NA, WANG MB. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 452–457.
- [64] WILSON TMA. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen derived resistance blossoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3134–3141.
- [65] WOLFFE AP, MATZKE MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; **286**: 481–486.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 13.05.2002 r.

Przyjęto: 22.07.2002 r.

*Instytut Genetyki Roślin PAN
Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań,
Email: pleh@igr.poznan.pl*

MONO- I DISACHARYDY – DROŹDŹOWYMI, ROŚLINNYMI I ZWIERZĘCYMI CZĄSTECZKAMI SYGNAŁOWYMI REGULUJĄCYMI EKSPRESJĘ GENÓW*

MONO- I DISACCHARIDES – SIGNALING MOLECULES REGULATING
GENES EXPRESSION IN YEASTS, PLANT AND ANIMAL CELLS

Anna HETMANN, Stanisław KOWALCZYK

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

Streszczenie: Niektóre mono- i disacharydy pełnią w komórce funkcję cząsteczek sygnałowych regulujących ekspresję genów. W komórkach drożdży pączkujących błonowe sensory glukozy Snf3 i Rgt2 aktywują szlaki sygnałowe regulujące ekspresję genów kodujących transportery glukozy. Błonowy receptor glukozy Gpr1 współdziałający z białkiem G aktywuje łańcuch transdukcji sygnału obejmujący cyklazę adenylanową i kinazę białkową A. Wyniki wielu dotychczasowych badań sugerują, że zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia glukozy są rejestrowane przez heksokinazę2 (Hxk2). Kluczową pozycję w sygnalizacji cukrowcowej zajmuje wielkocząsteczkowy kompleks SNF1, w skład którego wchodzi kinaza białkowa Snf1, białko Snf4 oraz jedno z białek łącznikowych (Sip1, Sip2 lub Gal83). Kompleks SNF1 fosforyluje białka regulujące transkrypcję wpływając w ten sposób na ekspresję genów biorących udział w odpowiedzi na glukozę. W ostatnich latach wzrosła liczba doniesień na temat roślinnych szlaków sygnałowych aktywowanych przez glukozę, sacharozę i regulowanych przez trehalozę. Niektóre elementy skomplikowanego układu sygnalizacji cukrowcowej (błonowe białka sensorowe, heksokinaza, kompleksy SNF i SCF, kinazy i fosfatazy białkowe) są homologami białek drożdżowych tworzących kaskadę sygnałową aktywowaną przez glukozę. Szlaki transdukcji sygnałów cukrowcowych wraz ze szlakami hormonalnymi i szlakami odpowiedzi na sygnały środowiska zewnętrznego tworzą w komórkach roślinnych złożoną sieć sygnalizacyjną. W komórkach ssaków złożone odpowiedzi na glukozę są zależne od jej fosforylacji oraz reakcji towarzyszących zmianom hormonalnym zależnym od glukozy. Stosunkowo dobrze poznany mechanizm sygnalizacji glukozowej w komórkach β trzustki reguluje ekspresję genu proinsuliny, a przez wzrost stosunku ATP: AMP wpływa na depolaryzację błony, aktywację kanałów wapniowych bramkowanych napięciem i wzrost sekrecji insuliny.

Słowa kluczowe: szlaki sygnalizacji cukrowcowej, białka sensorowe, mutanty cukrowcowe, drożdże, *Arabidopsis thaliana*, komórki β trzustki.

*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 6P04C 05616.

Summary: Some mono- and disaccharides act as signaling molecules that control gene expression. In the yeast, two transporter-like proteins (Snf3, Rgt2) have been shown to function as glucose sensor in a pathway for glucose induction of transporter genes. Another G-protein coupled receptor Gpr1 activates signaling pathway containing adenylate cyclase and protein kinase A. Results of many investigations suggest that in yeast cells a hexokinase plays important role in sensing endogenous levels of glucose. A central component of the sugars signaling pathways is SNF1 protein complex. This high molecular mass complex contains Snf1 protein kinase, Snf4 protein and bridging protein (Sip1, Sip2 or Gal83). The SNF1 complex regulates function of glucose-responsive transcriptional activators. In plant cells, there is increasing evidence for a diverse array of glucose, sucrose and trehalose induced signaling mechanisms. Plant sugar-response pathways may employ homologs of some of the components of yeast sugar-signaling cascades (membrane sugar sensors, hexokinase, SNF and SCF complexes, kinases and protein phosphatases). Characterization of the plant sugar signaling pathways is complicated by the fact that they form part of a complex regulatory web that also includes phytohormones and environmental-response pathways. In mammals, the response to glucose is complex because it combines effects related to glucose metabolism and to glucose-dependent hormonal modifications. Well-characterized glucose signaling in pancreatic β -cells regulates expression of the proinsulin gene. The recent studies indicate that the glucose-dependent increase in the ATP : AMP ratio causes membrane depolarization, activating voltage-gated Ca^{2+} -channels and insulin secretion.

Key words: sugars signaling pathways, sugar sensors, sugar response mutants, yeast, *Arabidopsis thaliana*, pancreatic β -cells.

WSTĘP

Niektóre mono- i disacharydy regulują ekspresję wielu genów, których produkty są zaangażowane w procesy glikolizy, oddychania i fotosyntezy, reakcje syntezy oraz degradacji sacharozy i skrobi, metabolizm związków azotu, a także mechanizmy regulujące cykl komórkowy oraz reakcje obronne. Wątpliwości podnoszone w przeszłości w związku z badaniami sygnalizacji cukrowcowej wynikały w dużej mierze z trudności oddzielenia funkcji sygnałowej cukrów od ich funkcji metabolicznej. Dzisiaj już wiadomo, że glukoza oraz niektóre disacharydy, podobnie jak wiele substancji sygnałowych i hormonalnych, aktywują odrębne szlaki przekazywania sygnałów regulujących ekspresję genów. Zmiany stężenia cukrów są odbierane bezpośrednio przez swoiste białka sensorowe lub pośrednio przez białka lub enzymy rejestrujące zmiany stężenia metabolitów glukozy lub zmiany energetyczne towarzyszące jej przemianom. Obecnie uwaga wielu badaczy koncentruje się na próbach poznania białek sensorowych rejestrujących zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe stężenie cukrów i generujących sygnały aktywujące kaskadę reakcji prowadzących do zmian w ekspresji genów lub modyfikacji aktywności enzymów. Niniejsza praca jest próbą podsumowania osiągnięć w poznawaniu sygnalizacji cukrowcowej u drożdży, roślin i zwierząt, ze szczególnym zwróceniem uwagi na te dokonania, które stały się możliwe dzięki wprowadzeniu technik biologii molekularnej.

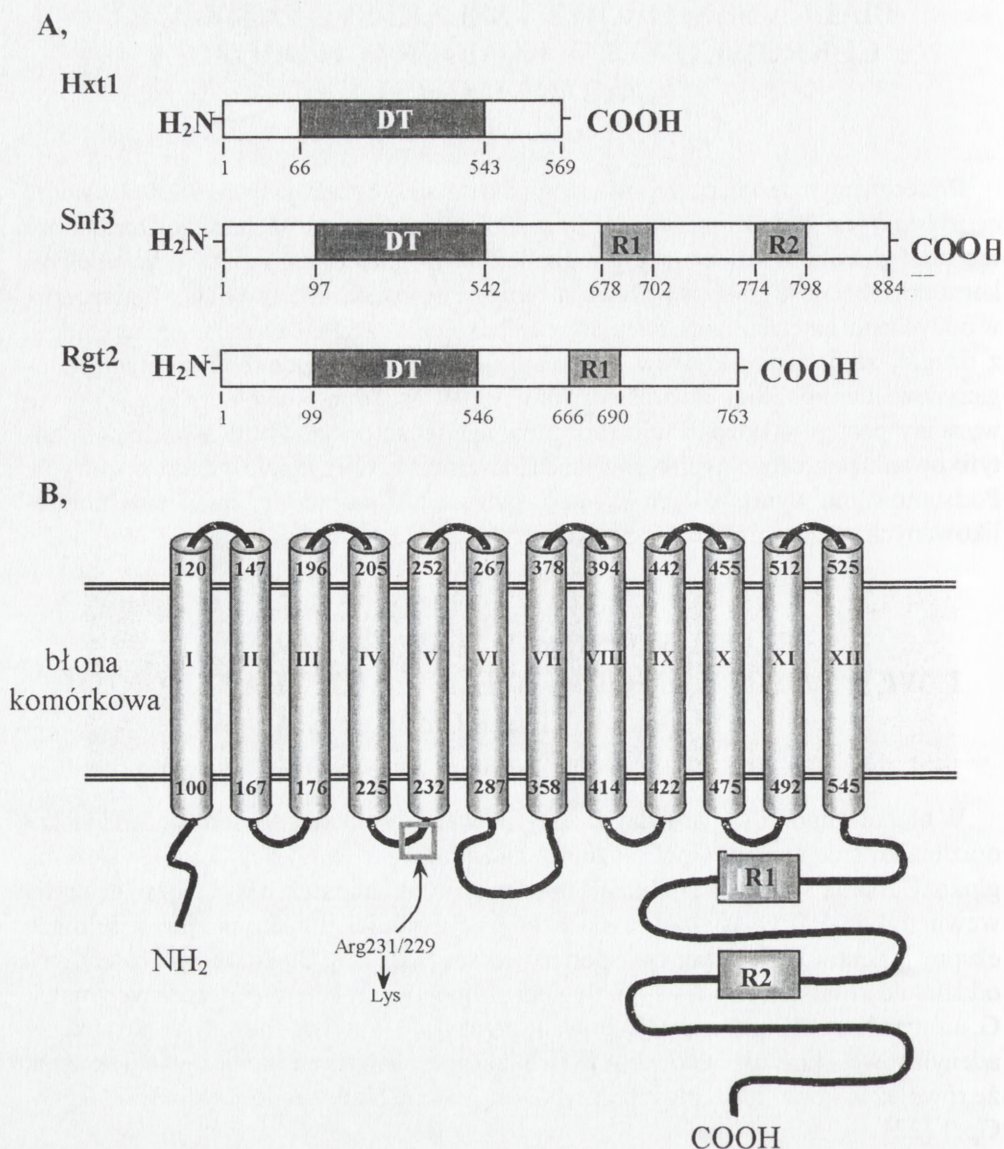
BIAŁKA SENSOROWE I SZLAKI SYGNALIZACJI CUKROWCOWEJ W KOMÓRKACH DROŻDŻY PĄCZKUJĄCYCH

Preferowanym źródłem węgla i energii dla drożdży pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*) jest glukoza oraz blisko z nią spokrewnione monosacharydy. Dostępność lub brak glukozy w środowisku jest dla drożdży sygnałem regulującym metabolizm komórki. Obecność glukozy wpływa na represję genów, których produkty funkcjonują w oddychaniu i metabolizmie alternatywnych źródeł węgla (galaktoza, maltoza, etanol), z drugiej zaś strony aktywuje ekspresję genów związanych z fermentacją, magazynowaniem glukozy i wzrostem komórki. W ostatnim pięcioleciu zaznaczył się wyraźny postęp w poznawaniu drożdżowych sensorów glukozy, a także w identyfikowaniu poszczególnych ogniw łańcuchów transdukcji sygnałów cukrowcowych. Podsumowaniu wyników tych badań poświęcono kilka prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach angielskojęzycznych [22,43,49,76].

BŁONOWE BIAŁKA SENSOROWE I WEWNĄTRZKOMÓRKOWE SZLAKI TRANSDUKCJI SYGNAŁU GLUKOZOWEGO

W błonie komórkowej drożdży zidentyfikowano dwa białka sensorowe Snf3 i Rgt2 oraz białko receptorowe Gpr1 reagujące na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy. Białka Snf3 i Rgt2 odbierają informację o zmianie stężenia glukozy i generują wewnątrzkomórkowy sygnał przenoszony na czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów kodujących transportery heksoz [8,22,65]. Białko receptorowe Gpr1 oddziałuje z białkiem Gpa2 – homologiem polipeptydu α heterotrimerycznych białek G, a zmiany stężenia glukozy rejestrowane przez Gpr1 wpływają na aktywność cyklazy adenylationowej i kinazy białkowej A [85]. Nieliczne, jak na razie, doniesienia wskazują, że również w komórkach innych grzybów są obecne białka podobne do Snf3, Rgt2 i Gpr1 [22].

Białka Snf3 i Rgt2 należą do rodziny drożdżowych transporterów heksoz (Hxt) – grupy liczącej 20 homologicznych białek o zróżnicowanym powinowactwie do glukozy. Wartości K_M względem glukozy mieszczą się w przedziale od 1,5 mM (Hxt6p) do 100 mM (Hxt1p) [5]. Snf3 i Rgt2, podobnie jak typowe transportery heksoz, mają 12 fragmentów transbłonowych i dodatkowo stosunkowo długie fragmenty C-końcowe tworzące domeny wewnątrzkomórkowe (ryc. 1A i 1B) [64]. Różniące się pod względem długości fragmenty C-końcowe zawierają jeden (w Rgt2) lub dwa (w Snf3) charakterystyczne 25-aminokwasowe motywy, w których obrębie mieszczą się krótkie w pełni konserwatywne sekwencje z aminokwasami ulegającymi fosforylacji i



RYCINA 1. Schemat budowy drożdżowego transportera glukozy Hxt1 oraz błonowych sensorów glukozy Snf3 i Rgt2: A – Schemat budowy polipeptydów z zaznaczoną domeną transbłonową (DT) oraz konserwatywnymi motywami R1 i R2 położonymi w części C-końcowej łańcucha polipeptydowego; B – białko Snf3 zawierające 12 fragmentów transbłonowych i dwa konserwatywne motywy R1 i R2; prostokątem zaznaczono miejsce mutacji odpowiedzialnej za konstytutywną odpowiedź na glukozę (na podstawie [5,22,64,65])

tworzącymi miejsca wiążące nukleotydy [22]. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy odbierane przez Snf3 i Rgt2 regulują ekspresję genów kodujących transportery heksoz o zróżnicowanym powinowactwie do glukozy. Białko Snf3 o wysokim powinowactwie do glukozy funkcjonuje jako sensor reagujący na małe stężenie cukru,

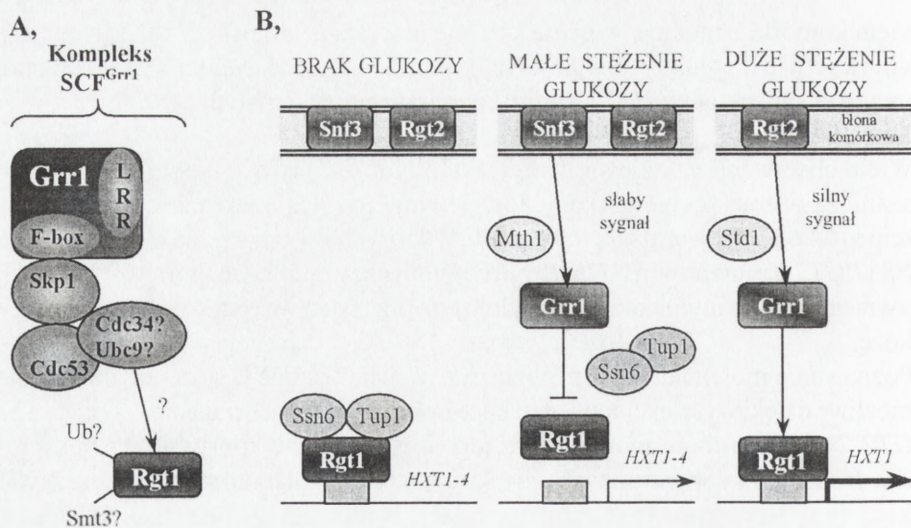
bowiem komórki z mutacją w genie *snf3* nie mają transporterów Hxt2,3 i 4 o dużym powinowactwie do glukozy [64,65]. Białko Rgt2 reagujące na duże stężenie glukozy aktywuje ekspresję genu *HXT1* kodującego transporter o małym powinowactwie do glukozy [64].

Wiele obserwacji wydaje się świadczyć o tym, że obydwa białka sensorowe nie uczestniczą w transporcie glukozy, lecz jedynie rejestrują jej zewnątrzkomórkowe stężenie [64,65]. Potwierdzają to badania, w których wykazano, że ekspresja genów *SNF3* i *RGT2* u mutantów *hxt1-hxt7* pozbawionych w ogóle transporterów heksoz nie przywraca zmutowanym komórkom zdolności przeżycia w środowisku zawierającym glukozę.

Poznanie molekularnego mechanizmu „czucia” różnic w stężeniu glukozy staje się możliwe dzięki wyselekcjonowaniu komórek zawierających mutacje w genach *SNF3* i *RGT2*. Należy tu m.in. mutant, u którego obserwuje się konstytutywną ekspresję genów *HXT1,2,3* i *4* w warunkach, gdy środowisko zewnątrzkomórkowe nie zawiera glukozy [65]. Szczegółowe badania wykazały, że mutacja w obu genach kodujących białka sensorowe dotyczy argininy konserwatywnej we wszystkich transporterach heksoz, która w wyniku mutacji została zastąpiona przez lizynę (pozycja 231 w Rgt2 i 229 w Snf3) (ryc. 1B). Tak więc zamiana pojedynczego aminokwasu położonego w krótkiej cytoplazmatycznej pętli prowadzi do zmian konformacji białka sensorowego, których efektem jest konstytutywna aktywacja szlaku sygnałowego ujawniająca się w zmianach ekspresji genów *HXT* [65]. W generowaniu sygnału wewnątrzkomórkowego uczestniczy C-końcowy fragment obu białek. Świadczą o tym wyniki doświadczeń, w których fragment genu *SNF3* kodujący domenę wewnątrzkomórkową dołączono do genu *HXT1* lub *HXT2*. Ekspresja takiego genu daje chimeryczne białko, które pełni funkcję sensora Snf3 [64]. Do podobnych wniosków prowadzą również wyniki doświadczeń, w których uzyskiwano komórki z nadekspresją samego tylko fragmentu C-końcowego Snf3. Okazało się, że nadekspresja tego fragmentu u mutantu *snf3* znosi defekt wynikający z mutacji i umożliwia wzrost komórek w środowisku zawierającym małe stężenie glukozy [17,87].

Obecność w obu sensorach konserwatywnego motywu R uczestniczącego w generowaniu wewnątrzkomórkowego sygnału sugeruje, że obydwa białka oddziałują z tym samym lub podobnym składnikiem łańcucha sygnałowego przekazującego informację do jądra komórkowego [64]. Niektórzy autorzy uważają, że tym ogniwem jest serynowo/treoninowa kinaza białkowa SKS1 [cyt. za 65], ale wyniki innych badań dowodzą, że białkami oddziałującymi z fragmentami C-końcowymi obu sensorów są białka Mth1p i Std1p [22]. Mth1 zlokalizowane w regionie przybłonowym cytoplazmy oraz w jądrze komórkowym wydaje się pełnić funkcję represora genów regulowanych przez Snf3. Podobną rolę gra białko Std1 oddziałujące z sensorem Rgt2 (ryc. 2B).

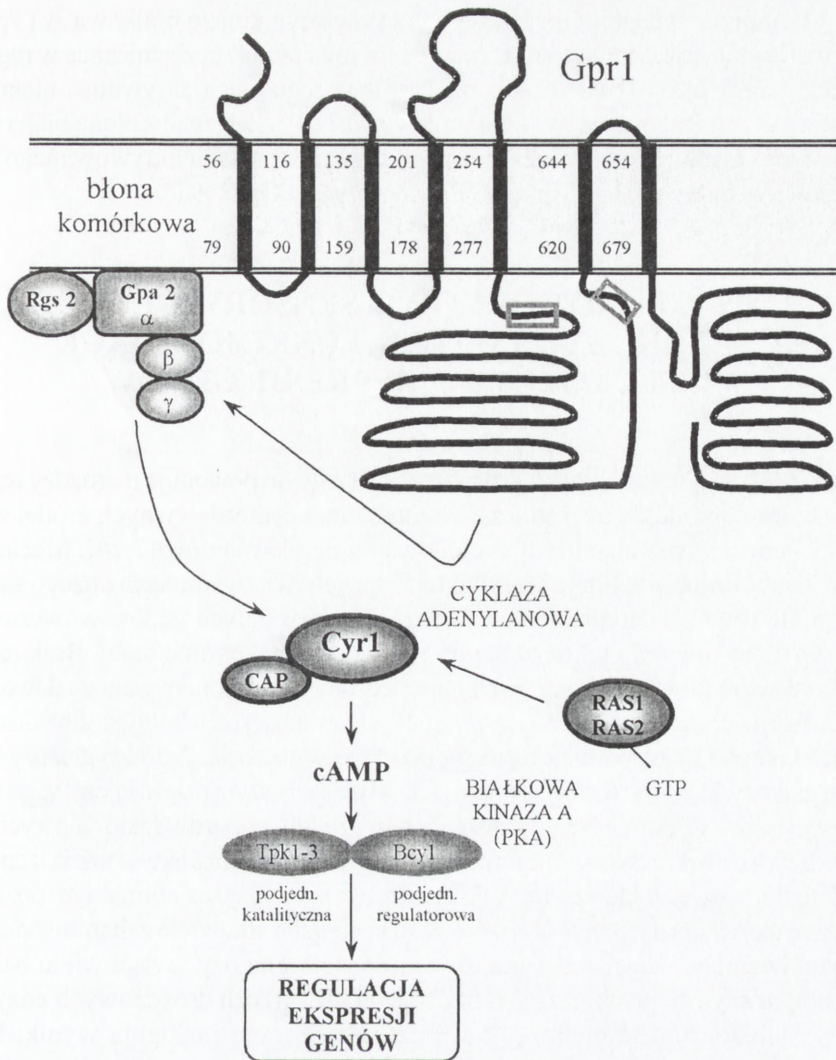
Kluczowym ogniwem łańcucha sygnałowego aktywowanego przez obydwa białka sensorowe jest kompleks SCF^{Grr1} (ryc. 2A). Nazwa SCF pochodzi od trzech białek tworzących kompleks: Skp1, białka Cdc53 z rodziny kulin (*culin*) oraz białka Grr1. Grr1 zawiera charakterystyczny motyw F odpowiedzialny za oddziaływanie z białkiem



RYCINA 2. Schemat budowy kompleksu SCF^{Grr1} oraz szlaku transdukcji sygnału glukozowego regulującego ekspresję genów kodujących transportery heksoz: A – kompleks SCF^{Grr1} tworzą białka: Skp1, Cdc53 i białko Grr1 zawierające motyw bogaty w leucynę (LRR) oraz charakterystyczną kasetę F swoiście wiążącą białko przeznaczone do ubikwitynacji; B – kaskady sygnałowe aktywowane przez Snf3 i Rgt2 regulujące ekspresję transporterów Hxt o zróżnicowanym powinowactwie do glukozy (na podstawie [5,43,49,65,66,76])

Skp1 oraz domenę LRR (*leucine rich repeat*) uczestniczącą w wiązaniu białka substratowego ulegającego ubikwitynacji [44,53]. W skład kompleksu SCF wchodzi jeszcze białko Cdc34 funkcjonujące w reakcji ubikwitynacji [66]. Rola kompleksu białkowego SCF^{Grr1} polega na swoistym znakowaniu białek przeznaczonych do proteolitycznej degradacji w proteasomach. Jednym z takich białek jest czynnik transkrypcyjny Rgt1 zawierający w części N-końcowej motyw palca cynkowego. Rgt1 pełni funkcję represora w warunkach, gdy w środowisku brak jest glukozy bądź aktywatora transkrypcji przy wysokim zewnątrzkomórkowym stężeniu glukozy (ryc. 2B). Przy małym stężeniu glukozy Rgt1 nie wykazuje żadnej aktywności. W represji genów *HXT1-4* są zaangażowane jeszcze dwa inne białka korepresorowe Ssn6 i Tup1, które przypuszczalnie są degradowane w warunkach dużego stężenia glukozy [82].

W ostatnich latach opublikowano szereg doniesień świadczących o tym, że oprócz białek Snf3 i Rgt2 w percepcji sygnału glukozowego w błonie plazmatycznej drożdży uczestniczy również typowe białko receptorowe Gpr1 [48,85,96,98]. Gpr1 ma siedem hydrofobowych fragmentów transbłonowych, stosunkowo dużą wewnątrzkomórkową pętlę oraz długi fragment C-końcowy (ryc. 3). Cytoplazmatyczna pętla położona między piątym a szóstym fragmentem transbłonowym, wyraźnie większa od pozostałych, zawiera dwa charakterystyczne motywy występujące w białkach receptorowych współdziałających z białkami G [48,96]. Obecność tych motywów nie jest przypadkowa, bowiem okazało się, że Gpr1 oddziałuje z białkiem Gpa2 ho-mologicznym z polipeptydem α heterotrimerycznych białek G [12,48,88,91]. Duże



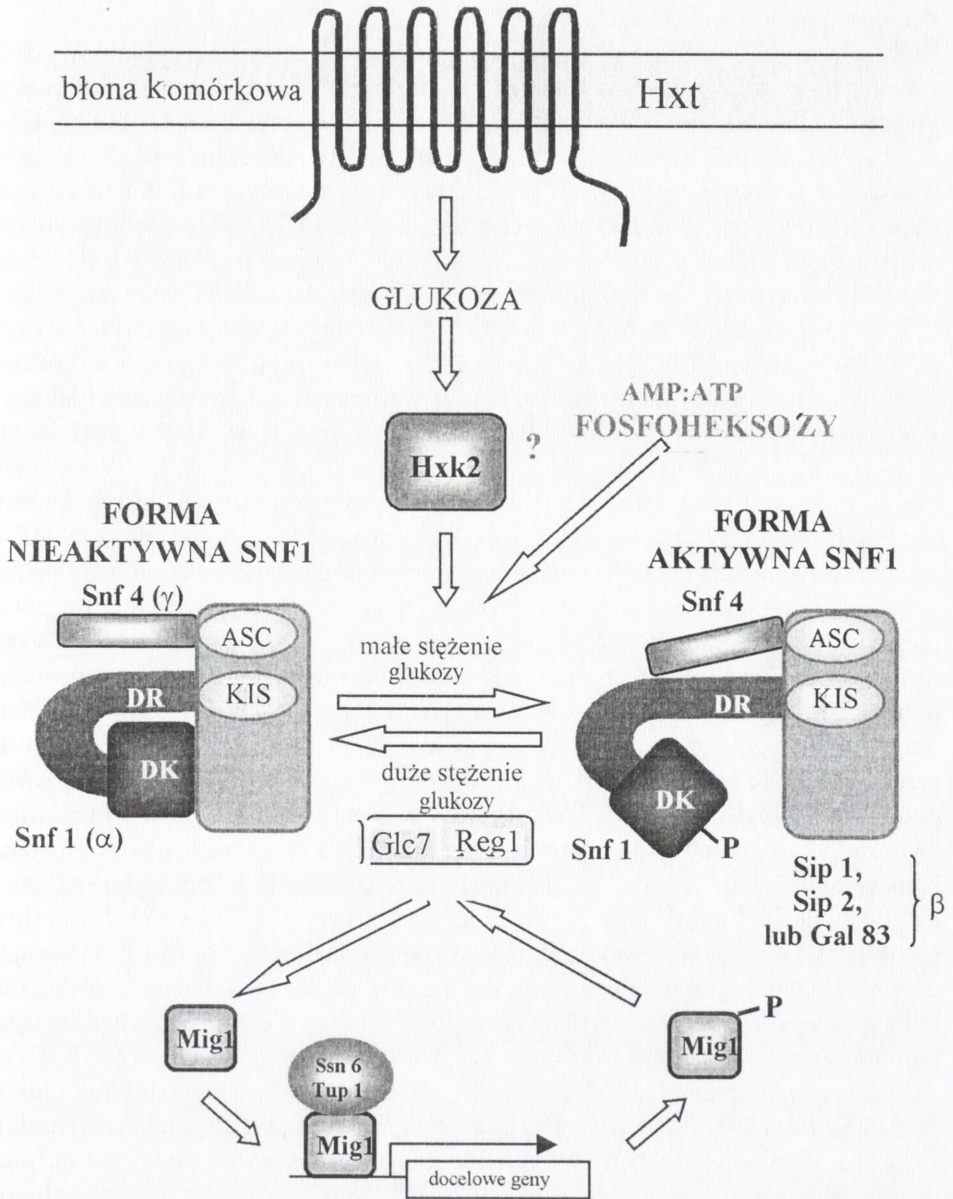
RYCINA 3. Schemat błonowego receptora glukozy Gpr1 współdziałającego z białkiem G (Gpa2) w aktywacji szlaku sygnałowego utworzonego przez cyklazę adenylianową (Cyrl), kinazę białkową A (Tpk1-3/Bcy1) i białko regulatorowe (Rgs2); prostokątami zaznaczono położenie w Gpr1 konserwatywnych motywów występujących w białkach receptorowych oddziałujących z białkami G (na podstawie [12,48,76,85,88,91,96])

stężenie glukozy odbierane przez Gpr1 aktywuje za pośrednictwem Gpa2 cyklazę adenylianową Cyrl, w wyniku czego następuje przejściowy wzrost stężenia cAMP. Niektóre doniesienia zwracają uwagę na fakt, iż aktywność cyklazy adenylianowej może być również regulowana przez ufosforylowane heksozy [75,85], a także białka Ras przekazujące informację o zmianach kwasowości wnętrza komórki (ryc. 3). Sygnał

generowany przez receptor Gpr1 aktywuje ostatecznie kinazę białkową A (Tpk1-3/Bcy1) fosforylującą czynniki transkrypcyjne (Msn2 i Msn4) uczestniczące w regulacji ekspresji genów aktywowanych przez stres oraz regulującą aktywność niektórych enzymów uczestniczących w metabolizmie węgla [85]. Związane z błoną białko Rgs2 pełni przypuszczalnie funkcję negatywnego regulatora szlaku aktywowanego przez Gpr1, bowiem aktywuje hydrolizę GTP związanego z Gpa2 [91].

WEWNĄTRZKOMÓRKOWE SENSORY GLUKOZY I SZLAKI SYGNAŁOWE FUNKCJONUJĄCE W GLUKOZOWEJ REPRESJI GENÓW

Glukoza obecna w środowisku zewnątrzkomórkowym powoduje u drożdży represję genów, których produkty uczestniczą w metabolizmie alternatywnych źródeł węgla, glukoneogenezie, oddychaniu i funkcjonowaniu peroksysomów [7,24]. Mechanizm represji katabolicznej obejmuje nie tylko represję genów w warunkach dużego stężenia glukozy, ale również derepresję i aktywację ekspresji innych genów wówczas, gdy środowisko nie zawiera glukozy lub gdy jej stężenie jest bardzo małe. Brak represji glukozowej w zmutowanych komórkach z upośledzonym transportem glukozy dowodzi, że białka sensorowe reagujące na zmiany stężenia glukozy lub jej metabolity są zlokalizowane wewnątrz komórki. Występowanie represji glukozowej w obecności 2-deoksyglukozy (2dG), analogu glukozy, który jest fosforylowany, lecz nie ulega dalszym przemianom, sugeruje, że białko sensorowe rejestruje zmiany stężenia glukozy lub jej estrów fosforanowych [43]. Potwierdzają to również obserwacje mutantów z drastycznie obniżoną aktywnością izomeryzy glukozyfosforanowej, u którego represja glukozowa występuje na normalnym poziomie, mimo że reakcja izomeryzacji fosfoheksoz została niemal całkowicie zahamowana [24]. W poszukiwaniach wewnątrzkomórkowego sensora glukozy uwaga wielu badaczy od lat skupia się na heksokinazie2 (Hxk2), jednym z trzech drożdżowych enzymów mogących fosforylować glukozę. Na szczególną uwagę zasługują wyniki badań stwierdzające, iż mutacja w genie *HXK2* znosi glukozową represję genów, mimo że aktywność pozostałych dwóch kinaz pozostaje na normalnym poziomie [35]. Do podobnych wniosków prowadzą także wyniki innych doświadczeń, w których stwierdzono, że nadekspresja genu glukokinazy *GLK1* u podwójnego mutantu *hxx1/hxx2* nie zawierającego w ogóle aktywnej heksokinazy nie przywraca represji glukozowej [24]. Ponadto wyniki doświadczeń prowadzonych na kilku liniach mutantów *hxx2* zwróciły uwagę na istnienie korelacji między poziomem represji glukozowej a zmieniającą się w wyniku mutacji aktywnością Hxk2. Stwierdzono też, że heksokinaza2 występuje *in vivo* w formie ufosforylowanego monomeru oraz nieufosforylowanego dimeru, jednak nie udało się jednoznacznie wykazać, iż fosforylacja Hxk2 ma związek z represją glukozową [24,72]. Nowe światło na rolę heksokinazy2 mogą rzucić wyniki ostatnich badań stwierdzające, że enzym jest zlokalizowany nie tylko w cytoplazmie,



RYCINA 4. Schemat przedstawiający mechanizm regulacji kompleksu SNF1; wewnątrzkomórkowy sensor glukozy heksokinaza2 (Hxk2) aktywuje szlak sygnałowy uczestniczący w glukozowej represji genów; kluczową pozycję w łańcuchu sygnałowym zajmuje kompleks SNF1 utworzony przez kinazę białkową Snf1, białko regulatorowe Snf4 i białko łącznikowe Sip1, Sip2 lub Gal83; białkowymi elementami szlaku sygnałowego są również fosfataza białkowa (Glc7/Reg1), czynnik transkrypcyjny Mig1 oraz białka korepresorowe (Ssn6/Tup1); szczegółowy opis w tekście (na podstawie [7,24,31,43, 45])

ale również w jądrze komórkowym, gdzie wiąże się z elementem *cis* genu *SUC2* kodującego sekrecyjną inwertazę [33,71].

Kluczowym elementem szlaku represji glukozowej jest kompleks białkowy SNF1 zawierający serynowo/treoninową kinazę białkową Snf1 (podjednostka α kompleksu), a oprócz tego białko Snf4 (podjednostka γ) oraz jedno z białek Sip1, Sip2 lub Gal83 określanych jako podjednostka β kompleksu (ryc. 4) [31]. Kinaza białkowa Snf1 zawiera w części N-końcowej (pozycje od 1 do 391) domenę katalityczną (DK), natomiast w części C-końcowej (392-633) domenę regulatorową (DR) [31]. Polipeptyd Snf4 zbudowany z 322 reszt aminokwasowych reguluje aktywność kinazy Snf1. Białka Sip1, Sip2 lub Gal83 występujące zamiennie w kompleksie SNF1 zawierają w części C-końcowej domenę ASC (*association with SNF1 complex*) wiążącą Snf4, a w części środkowej domenę KIS (*kinase interaction sequence*) oddziałującą z C-końcową domeną regulatorową Snf1 (ryc. 4) [31]. W warunkach dużego stężenia glukozy w środowisku (warunki represyjne) domena regulatorowa (DR) kinazy Snf1 hamuje aktywność kinazową poprzez oddziaływanie z domeną katalityczną (DK). W warunkach gdy w środowisku brak jest glukozy lub gdy jej stężenie jest małe, białko regulatorowe Snf4 oddziałuje z domeną regulatorową (DR) powodując uwolnienie domeny DK i w efekcie aktywuje Snf1 [31]. Nie jest jasne, czy wiązanie domeny regulatorowej z domeną katalityczną zapobiega fosforylacji tej ostatniej, czy też fosforylacja Snf1 przez inną nieznaną jeszcze kinazę białkową rozluźnia wiązanie między obu domenami. Wyniki niektórych doświadczeń sugerują, że aktywność kinazy Snf1 jest regulowana pośrednio poprzez zmiany stosunku stężeń AMP do ATP. Duże stężenie AMP w warunkach braku lub małego stężenia glukozy aktywuje odrębną kinazę białkową aktywowaną przez AMP, która fosforyluje Snf1 [7,31]. Podobny mechanizm regulacji kinazy AMPK przez kinazę białkową (AMPKK) aktywowaną przez AMP poznano niedawno u zwierząt [31]. W regulacji aktywności kompleksu SNF1 uczestniczy również fosfataza białkowa Glc7, która poprzez podjednostkę regulatorową Reg1 oddziałuje z domeną katalityczną Snf1 powodując jej defosforylację (ryc. 4) [7,8,24,42]. Naturalnym substratem kinazy białkowej Snf1 jest czynnik transkrypcyjny Mig1 wykazujący powinowactwo względem promotorów kilku genów podlegających represji glukozowej m.in. genów *SUC* i *GAL*. Białko Mig1 jest zlokalizowane w cytoplazmie bądź w jądrze komórkowym w zależności od tego, czy zostało ufosforylowane przez Snf1 czy defosforylowane przez fosfatazę białkową. W warunkach małego stężenia glukozy aktywna kinaza Snf1 fosforyluje Mig1 hamując jego transport do jądra lub stymulując eksport z jądra do cytoplazmy. W takich warunkach obserwuje się wzrost ekspresji genów hamowanych przez glukozę (ryc. 4) [8,15,63]. Rosnące stężenie glukozy powoduje inaktywację Snf1, co w sytuacji aktywnej fosfatazy Reg1-Glc7 prowadzi do przemieszczania się defosforylowanego Mig1 do jądra, gdzie jest wiązane przez sekwencje promotorowe genów ulegających represji [15]. W represji wielu genów obok Mig1 uczestniczą jeszcze białka korepresorowe Ssn6 i Tup1 (ryc. 4) [45].

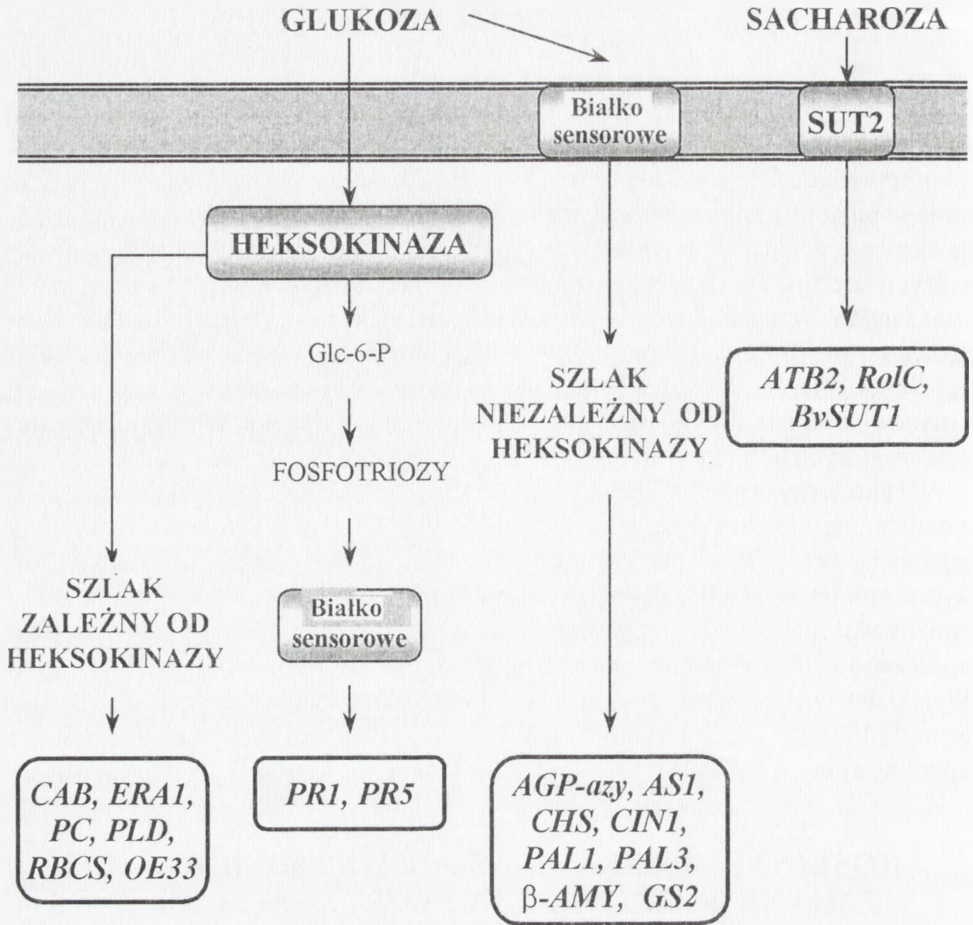
SYGNALIZACJA CUKROWCOWA W ROŚLINACH WYŻSZYCH

Poznanie szlaków sygnalizacji glukozowej u drożdży inspirowało badaczy zajmujących się regulacją metabolizmu węgla i azotu w roślinach do podejmowania podobnych badań. Wyniki dotychczasowych poszukiwań jednoznacznie wykazały, że zmiany poziomu cukrów w roślinach wyższych wpływają aktywnie lub hamująco na ekspresję wielu genów. Na ogół spadek stężenia cukrów aktywuje ekspresję genów, których produkty są zaangażowane w procesie fotosyntezy oraz przemianach związanych z uruchamianiem zapasów i eksportem cukrów. Wzrost stężenia cukrów prowadzi do represji genów jądrowych i chloroplastowych, których produkty uczestniczą w fotosyntezie i aktywacji genów związanych z reakcjami magazynowania i metabolizmu cukrów. W pracach przeglądowych przytaczane są liczne przykłady genów, których ekspresja jest regulowana przez glukozę i sacharozę [67].

W cukrowcowej regulacji genów cząsteczki sygnałowe nie oddziałują bezpośrednio z białkami wiążącymi się z DNA, lecz podobnie jak u drożdży pobudzają określone sensory i aktywują szlaki przekazujące informację do jądra. Niemal od początku badań w centrum uwagi wielu badaczy pozostają białka sensorowe swoiście reagujące na zmiany stężenia określonego cukru. Podejmowane są także próby identyfikowania poszczególnych elementów łańcuchów przekazywania sygnałów cukrowcowych. Wyniki dotychczasowych badań są omawiane w licznych angielskojęzycznych pracach przeglądowych [26,30,41,46,52,73,74,76,79,80,81,94,97], a także w pracy opublikowanej w *Postęпах Biologii Komórki* [11].

ROŚLINNE BIAŁKA SENSOROWE ODBIERAJĄCE ZMIANY STĘŻENIA GLUKOZY I SACHAROZY

W dotychczasowych poszukiwaniach roślinnych sensorów glukozę najczęściej uwagi poświęcono heksokinazie. Zdecydowały o tym wyniki badań prowadzonych na drożdżach, a także wyniki doświadczeń wskazujące, iż represja glukozowa niektórych genów zachodzi w roślinach jedynie wówczas, gdy glukozę zostanie przetransportowana do wnętrza komórki. Większość obserwacji potwierdzających udział heksokinazy w rejestrowaniu zmian stężenia glukozę pochodzi z badań wykorzystujących różne analogi glukozę. Wyniki tych doświadczeń zostały wyczerpująco omówione w pracy przeglądowej opublikowanej w *Postęпах Biologii Komórki* [11]. Podobnie interpretowane są również wyniki badań prowadzonych na transgenicznym liniach *A. thaliana* z wprowadzonym genem heksokinazy *AtHXX* w pozycji sensownej i antysensownej, a także zmiany fenotypowe towarzyszące całkowitemu wyłączeniu genu *AtHXX1* u mutantów *A. thaliana gin2-1* i *gin2-2* [cyt. za 74]. Z drugiej jednak strony Halford i wsp. [30] uważają, że efektem wprowadzenia do komórki jednego z analogów glukozę bądź inhibitora heksokinazy są drastyczne zmiany stosunku stężeń



RYCINA 5. Lokalizacja hipotetycznych sensorów glukozy i sacharozy aktywujących szlaki sygnałowe regulujące ekspresję odpowiednich genów; szlak sygnałowy zależny od heksokinazy reguluje ekspresję genów kodujących białko wiążące chlorofil a/b (CAB), fosfolipazę D (PLD), plastocyaninę (PC), małą podjednostkę karboksylazy rybulozo-1,5-bisfosforanowej (RBCS), białko uwalniające tlen (OE33); szlak sygnałowy niezależny od heksokinazy reguluje geny kodujące pirofosforylazę ADP-glukozy (AGP-aza), syntetazę asparaginową (AS1), syntetazę chalkonową (CHS), inwertazę ścian komórkowych (CIN1), amoniako-liazę fenyloalaniny (PAL1, PAL3), β-amylazę (β-AMY), syntetazę glutaminową (GS2); szlak aktywowany przez białko rejestrujące zmiany metabolitów fosfoglukozy reguluje geny *PR1* i *PR5* kodujące białka zaangażowane w reakcje obronne; szlak aktywowany przez sacharozę reguluje ekspresję genów kodujących czynnik transkrypcyjny (ATB2), transporter sacharozy (SUT1), a także aktywuje promotory genu patatyny i genu *RolC* z *Agrobacterium* w komórkach floemu (na podstawie [3,34,46,52,79,81,95])

AMP do ATP, które zwykle są pomijane w interpretacji wyników. Podobne wątpliwości budzą również wyniki doświadczeń, w których komórki podwójnego mutantu drożdżowego *hxx1-hxx2* transformowano genami *AtHXX1* i *AtHXX2* *A. thaliana* [40,41]. Ekspresja roślinnych genów heksokinazy przywraca w komórkach drożdży jedynie aktywność katalityczną, natomiast nie komplementuje funkcji sensorowej drożdżowej Hxx2.

Nowsze doniesienia zwracają uwagę na obecność w roślinach odrębnych szlaków glukozowych, w których hipotetycznymi sensorami są białka błonowe homologiczne z transporterami heksoz, a także białka rejestrujące zmiany stężenia produktu(ów) metabolizmu fosfoglukozy (ryc. 5) [30,34,46,52,74,79,81,95].

Wyniki nielicznych jeszcze badań sugerują, że białko sensorowe powinno być zlokalizowane w plazmolemie, ponieważ 3-metyloglukoza i 6-deoksyglukoza (analogi glukozy nie ulegające fosforylacji) aktywują w komórkach *Chenopodium rubrum* ekspresję apoplastowej inwertazy i syntazy sacharozy, a w *A. thaliana* ekspresję genu kodującego patatynę [30,32,73,74,80]. O błonowej lokalizacji sensora glukozy mogą również świadczyć wyniki doświadczeń, w których obserwowano efekty związane z ekspresją w liściach tytoniu drożdżowej sekrecyjnej inwertazy. Zmianom stężenia heksoz w apoplaście towarzyszy aktywacja genów związanych z mechanizmami obronnymi i represja genów, których produkty uczestniczą w fotosyntezie.

Jeszcze w innych badaniach stwierdzono, że ekspresja genów *PR1* i *PR5*, których produkty biorą udział w reakcjach obronnych przeciw patogenom jest zależna od heksokinazy, lecz szlak sygnałowy regulujący ekspresję tych genów jest aktywowany przez niezidentyfikowane białko sensorowe rejestrujące zmiany stężenia octanu lub innych metabolitów szlaku glikolitycznego [95].

Rośnie również liczba doniesień wskazujących, iż w komórkach co najmniej niektórych roślin oprócz szlaków sygnałowych aktywowanych przez glukozę funkcjonuje odrębny szlak aktywowany przez sacharozę (ryc. 5) [3,10,26,52,81]. Znana jest aktywacja ekspresji genu syntazy sacharozy [70], swoista represja genu *ATB2* kodującego czynnik transkrypcyjny bZIP [77] oraz genu kodującego białko transportujące sacharozę na zasadzie symportu z protonami [10]. Wyniki najnowszych doświadczeń wskazują, że również izomery sacharozy, takie jak: turanoza i palatynoza, a także trehaloza – disacharyd zbudowany z dwóch cząsteczek glukozy, mogą również pełnić funkcję cząstek sygnałowych [74]. Rola sensora aktywującego szlak sygnalizacji sacharozowej wiązana jest z produktem genu *SUT2* (*sucrose transporter2*) sklonowanym u pomidora i *A. thaliana* [3,52]. Genom *A. thaliana* zawiera dwa geny kodujące białka podobne do SUT2, których ekspresja jest aktywowana przez sacharozę [52]. Białko SUT2 ma 12 fragmentów transbłonowych oraz dwa charakterystyczne fragmenty wewnątrzkomórkowe niewystępujące w typowych transporterach sacharozy. Przedłużony fragment N-końcowy oraz cytoplazmatyczna pętla położona między 6 a 7 fragmentem transbłonowym mogą uczestniczyć w oddziaływaniach SUT2 z kolejnymi ogniwami łańcucha transdukcji sygnału [3].

KOMPLEKSY SNF I SCF, Ca^{2+} , KALMODULINA, KINAZY I FOSFATAZY BIAŁKOWE OGNIWAMI ŁAŃCUCHÓW PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU CUKROWCOWEGO

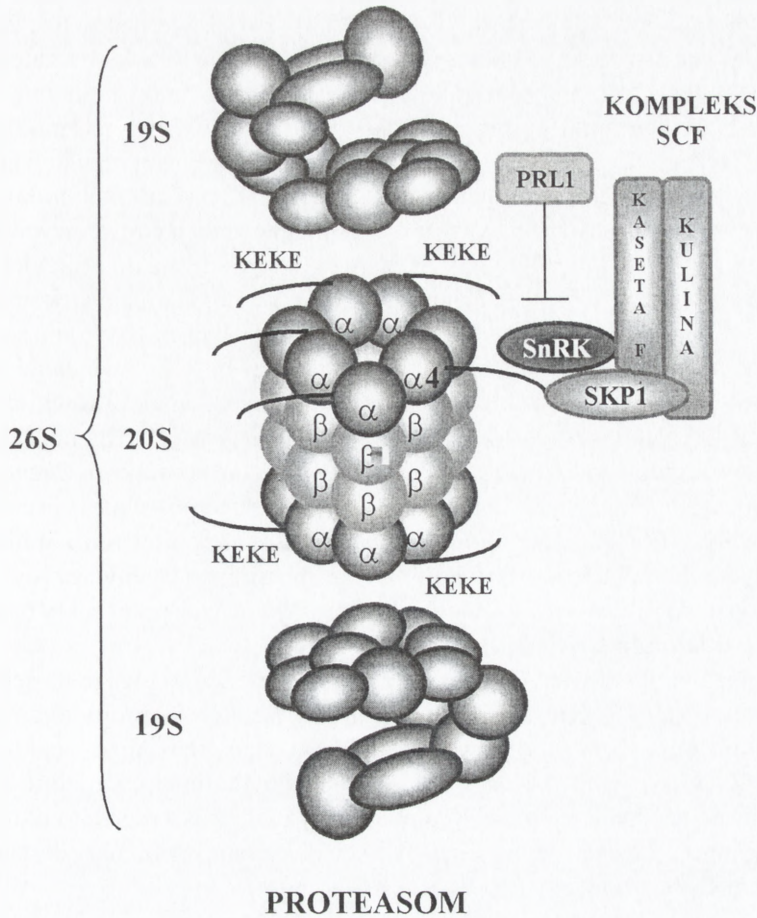
Roślinnymi homologami drożdżowej kinazy Snf1 i zwierzęcej kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) są kinazy SnRK (*SNF1-related protein kinases*) [29,31]. Geny kodujące SnRK w roślinach wyższych podzielono na trzy podrodziny na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej kodowanych białek oraz wzorca ekspresji poszczególnych genów. Do pierwszej podrodziny SnRK1 zaliczane są geny poznane w komórkach żyta, jęczmienia, ziemniaka, ryżu, owsa, buraka cukrowego, tytoniu i *A. thaliana* [29]. Wysoko konserwatywna domena katalityczna położona w części N-końcowej jest w 45–80% identyczna z sekwencją aminokwasową kinazy Snf1 drożdży oraz AMPK [29]. W bibliotece cDNA ziemniaka i *A. thaliana* znaleziono też klony kodujące białka homologiczne z Gal83 oraz Sip1 i Sip2 drożdży. [6,51]. Białko ziemniaka StubGAL83 zawiera obie charakterystyczne domeny ASC (*association with SNF1 complex*) i KIS (*kinase association domain*) uczestniczące w tworzeniu heterotrimerycznego kompleksu SNF1 (patrz ryc. 4). Udało się też zidentyfikować gen kodujący białko homologiczne z drożdżowym Snf4 – podjednostką γ kompleksu SNF [6], a także gen kodujący białko AtPTPKIS1 zawierające domenę charakterystyczną dla tyrozynowych fosfatyz białkowych oraz domenę oddziałującą z domeną KIS [21].

Rola kompleksu SNF1 w roślinnych szlakach sygnalizacji cukrowcowej jest jeszcze słabo poznana, tym nie mniej na uwagę zasługują wyniki doświadczeń prowadzonych na ziemniaku transformowanym genem *SnRK1 (PKIN1)* w pozycji antysensownej [70]. Okazało się, że obniżonej aktywności PKIN1 w roślinie transgenicznej towarzyszy wyraźne zahamowanie ekspresji genu syntazy sacharozy, a ponadto w liściach rośliny transgenicznej nie obserwowano aktywującego wpływu sacharozy na ekspresję genu kodującego enzym. Wykazano również, że geny kodujące SnRK żyta, tytoniu i *A. thaliana* wprowadzone do komórek zmutowanych drożdży mogą komplementować mutację *snf1* [29].

W regulacji aktywności roślinnych kinaz SnRK uczestniczy produkt genu *PRL1 (pleiotropic regulatory locus 1)* sklonowanego u *A. thaliana* [4]. Mutacja *prl1* prowadzi do derepresji szeregu genów regulowanych przez glukozę oraz wzrostu wrażliwości względem cukrów i niektórych hormonów [61]. Białko PRL1 jest białkiem regulatorowym zawierającym siedem powtórzeń charakterystycznego motywu WD-40 oddziałującego z importyną α – białkiem funkcjonującym w transporcie białek do jądra komórkowego [61]. PRL1 wiąże się z C-końcową domeną regulatorową drożdżowej Snf1 oraz jej roślinnymi odpowiednikami AKIN10 i AKIN11.

Pojedyncze doniesienia sugerują, że w regulacji SnRK uczestniczy również glukozoz-6-fosforan [86] oraz niezidentyfikowana jeszcze kinaza białkowa [83].

W glukozowej regulacji genów w roślinach, podobnie jak u drożdży, uczestniczy także kompleks SCF (patrz ryc. 2). Wcześniejsze badania związane z sygnalizacją



RYCINA 6. Schemat wielofunkcyjnego kompleksu uczestniczącego w swoistym znakowaniu i proteolitycznej degradacji białek regulujących transkrypcję; składnik kompleksu SCF zawierający kasetę F swoiście wiąże białko przeznaczone do ubiquitynacji; kompleks SNF1 z kinazą białkową SnRK wiąże się z proteasomem, w którym wyznakowane białko jest degradowane; białko PRL1 hamuje fosforylację białka przeznaczonego do degradacji w proteasomie (na podstawie [4,20,61])

auksynową doprowadziły do poznania w *A. thaliana* analogicznego kompleksu SCF^{TIR1} funkcjonującego w swoistej degradacji białek regulujących transkrypcję genów [100]. W ostatnim czasie u tej samej rośliny zidentyfikowano gen kodujący białko AtGRH1 homologiczne z drożdżowym białkiem Grr1 i roślinnym białkiem TIR1 [84]. AtGRH1 ma kasetę F determinującą swoiste wiązanie białek przeznaczonych do proteolitycznej degradacji. Białko AtGRH1 może oddziaływać z AtSKP1a i AtSKP1b, dwoma homologami drożdżowego białka SKP1 [84]. Ponadto stwierdzono, że nadekspresja w drożdżach roślinnych genów *SKP1* lub *AtGRH1* inaktywuje represor Mig1 [78]. Wyniki ostatnich doświadczeń wskazują, że kompleks SCF oddziałuje poprzez SKP1 z białkiem

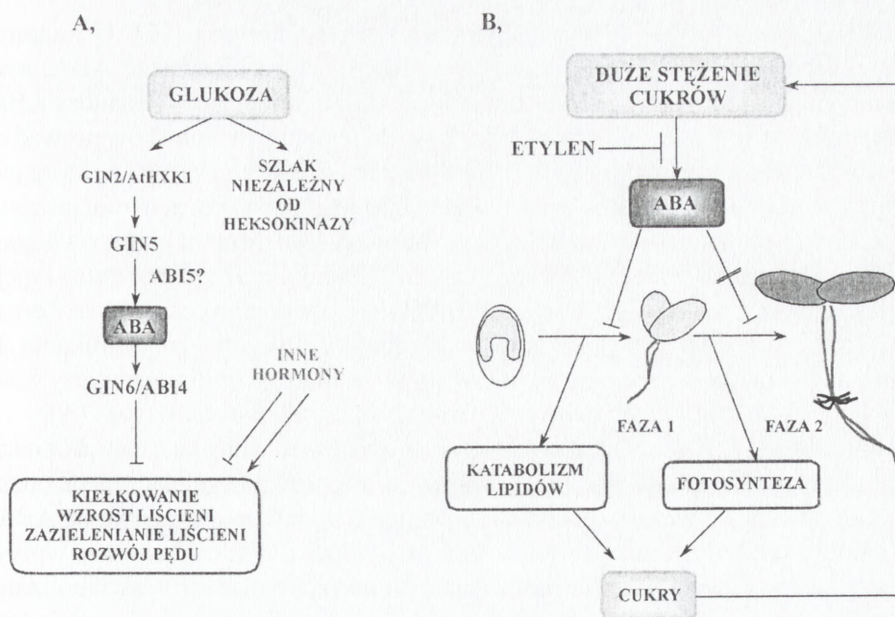
SnRK, które wiąże się z podjednostką $\alpha 4$ /PAD1 proteasomu zawierającą charakterystyczny konserwatywny motyw KEKE (ryc. 6) [20]. Stwierdzono też, że białko PRL1 wpływa na trwałość wiązania między SKP1 a SnRK. Można zatem przypuszczać, że jeden z kompleksów SCF współdziałający z kinazą białkową SnRK i proteasomem funkcjonuje, podobnie jak u drożdży, w swoistym znakowaniu i proteolitycznej degradacji białek uczestniczących w cukrowcowej regulacji genów.

Wyniki nielicznych jeszcze doświadczeń wskazują też na Ca^{2+} , kalmodulinę oraz aktywowane przez Ca^{2+} kinazy białkowe jako kolejne elementy cukrowcowych szlaków przekazywania sygnału [73,79,81,97]. Sacharoza wprowadzana do dojrzałej rośliny *A. thaliana* powoduje wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie tych komórek, do których dotarła fala podwyższonego stężenia cukru [23]. W liściach tytoniu sacharoza aktywuje ekspresję kinazy białkowej CDPK zależnej od Ca^{2+} związanej z błoną plazmatyczną [38]. O roli odwracalnej fosforylacji białek świadczą również wyniki stwierdzające, iż inhibitory białkowej fosfatazy 1 i 2A aktywują lub hamują ekspresję różnych genów regulowanych przez cukry [19,79,80,81]. W komórkach *Chenopodium rubrum* glukoza aktywuje kinazę białkowej MAP [19], a u topinamburu obserwowano hamujący wpływ EGTA i La^{3+} , inhibitorów kanałów wapniowych i inhibitorów kalmoduliny na akumulację transkryptów mRNA sporaminy i β -amylazy [cyt. za 81]. Podobny efekt obserwowano również w przypadku aktywowanej przez cukry biosyntezy antocyjanów u *Vitis vinifera* [92].

W badaniach podejmowanych w ostatnim czasie zwrócono uwagę na sekwencje regulatorowe niektórych genów regulowanych przez cukry. W promotorze genu β -amylazy u topinamburu zidentyfikowano sekwencję odpowiedzialną za cukrowcowa aktywację ekspresji genu α -Amy [56]. Podobne badania prowadzone na ryżu doprowadziły do poznania sekwencji promotorowej związanej z represją cukrowcowa genu α -Amy3 oraz sekwencji odpowiedzialnej za indukowaną przez cukry destabilizację transkryptu mRNA α -amylazy [9].

SZLAKI SYGNALIZACJI CUKROWCOWEJ SKŁADNIKAMI SIECI SYGNALIZACYJNEJ REGULUJĄCEJ WZROST I ROZWÓJ ROŚLINY

Dzięki badaniom prowadzonym na mutantach cukrowcowych *A. thaliana* daje się ostatnio zauważyć wyraźny przełom w poznawaniu szlaków sygnalizacji cukrowcowej [25,26,67,79]. W identyfikowaniu mutantów o zmienionej odpowiedzi na cukry nasiona mutagenizowane chemicznie poddawane są kiełkowaniu w środowisku zawierającym odpowiednio duże stężenie cukrów, które umożliwia jeszcze kiełkowanie, ale hamuje wzrost i rozwój rośliny. W ten sposób zidentyfikowano szereg mutantów określanych jako mutanty niewrażliwe na glukozę lub sacharozę: *gin* (*glucose insensitive*) [99], *sig* (*sucrose-insensitive growth*) [67], *sis* (*sugar-insensitive*) [27,50], *cai* (*carbohydrate-*



RYCINA 7. Cukrowcowa i hormonalna regulacja kiełkowania nasion oraz wzrostu i rozwoju siewki; A – schemat zależnego od heksokinazy glukozowego szlaku sygnałowego hamującego kiełkowanie nasion przez regulację poziomu endogenego ABA; B – hipotetyczny mechanizm cukrowcowej regulacji metabolizmu związków węgla w kiełkujących nasionach (faza 1) i rosnących siewkach (faza 2); szczegółowy opis w tekście (na podstawie [1,25,26,36,68,79,99])

insensitive) [67], *mig* (*mannose-insensitive germination*) [67]. Drugą grupę mutantów, określaną mianem mutantów nadwrażliwych na cukry, wyselekcjonowano na podstawie braku zdolności kiełkowania lub wzrostu na podłożu zawierającym cukier w takim stężeniu, które normalnie nie hamuje wzrostu. Do tej grupy należą mutanty: *gss* (*glucose supersensitive*) [67] i *sss* (*sucrose supersensitive*) [81]. Poznano też kilka mutantów charakteryzujących się różnymi defektami w ekspresji genu β -amylazy. Należą tu mutanty: *lba* (*low beta-amylase*), *ram* (*reduced beta-amylase*) i *hba* (*high beta-amylase*) [58,59].

W wyniku szczegółowej analizy niektórych mutantów cukrowcowych zwrócono uwagę na funkcjonalną współzależność szlaków cukrowcowych ze szlakami sygnalizacji hormonalnej. Mutant *gin1* jest fenotypowo zbliżony do mutantu etylenowego *eto1-1* z nadprodukcją etyleny lub mutantu *ctr1-1* z konstytutywną odpowiedzią na etylen [47,74]. Ponadto mutacja w genie kodującym jeden z receptorów etyleny *A. thaliana* (*etr1-1*) odpowiedzialna za spadek wrażliwości rośliny na etylen prowadzi do nadwrażliwości na glukozę [79,99]. Mutant *sis1* fenotypowo podobny do mutantu *ctr1* z konstytutywną odpowiedzią na etylen okazał się mutantem allelicznym z *ctr1-12* [27].

W badaniach prowadzonych na innej grupie mutantów wykazano, że sygnały cukrowcowe wpływają na metabolizm ABA oraz że szlaki cukrowcowe są powiązane

ze szlakami sygnałowymi aktywowanym przez ten fitohormon [25]. U mutantów niewrażliwego na glukozę *gin5* obserwowano upośledzoną biosyntezę ABA, a w najnowszych badaniach potwierdzono udział białka GIN5 w regulacji biosyntezy ABA w odpowiedzi na sygnał cukrowy (ryc. 7A). Do podobnych wniosków prowadzą również obserwacje mutantów *aba1,2* i *3* z defektami w biosyntezie ABA, które jak się okazało są również niewrażliwe na większe stężenie glukozy. Ponadto mutant *aba2* jest alleliczny z mutantem *sis4* niewrażliwym na cukry [50]. Mutant glukozowy *gin6* charakteryzuje się upośledzoną ekspresją genu *ABI4* kodującego regulator transkrypcji uczestniczący w reakcjach odpowiedzi na ABA [1,39]. W ostatnim czasie stwierdzono, że gen *ABI4* jest genem *SUN6* sklonowanym u niewrażliwego na cukry mutantu *A. thaliana* allelicznego z genem *sis5* [36,50], oraz że mutacja *gin6* towarzyszy brak ekspresji genu *ABI4/SUN6* aktywowanej przez wyższe stężenie cukru (ryc. 7A).

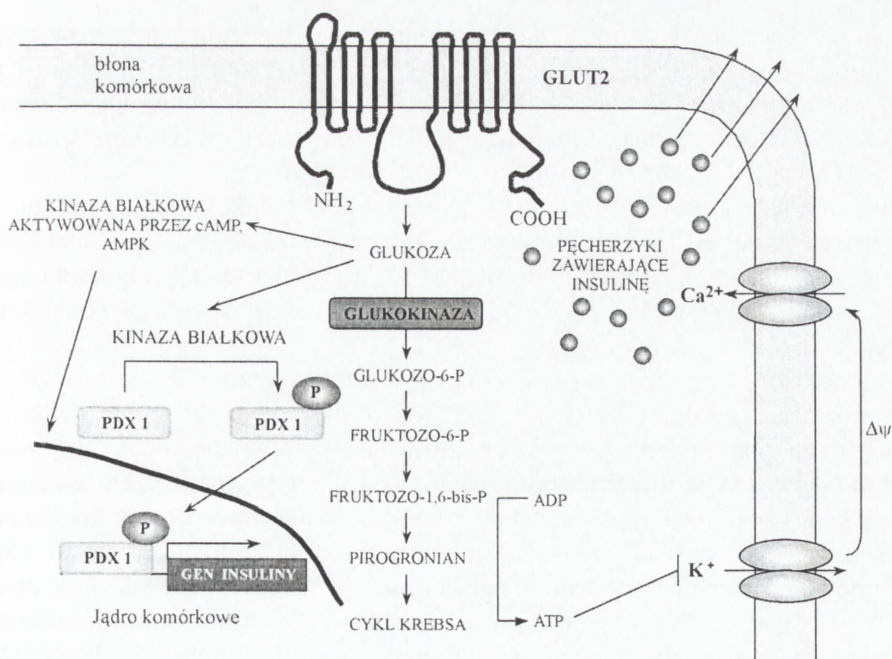
Wyniki większości dotychczasowych badań prowadzą do wniosku, że w nasionach szlak glukozowy zależny od heksokinazy wpływa na mechanizm regulujący metabolizm ABA [1]. Nasiona we wczesnej fazie kiełkowania są wyjątkowo wrażliwe na ABA, który hamuje katabolizm zmagazynowanych tu lipidów i białek. Hamujący wpływ cukrów na wzrost i rozwój zarodka można zatem tłumaczyć zmianami w metabolizmie ABA regulowanymi przez szlak glukozowy. Wrażliwość rosnącego zarodka względem ABA spada w kolejnych fazach wzrostu i dlatego efekt wywierany przez cukry na tym etapie jest już mocno ograniczony (ryc. 7B).

Szereg innych doniesień pokazuje, że szlaki cukrowe są powiązane ze szlakami sygnałowymi aktywowanymi przez cytokininy [37,62,93]. Wyniki nielicznych jeszcze doświadczeń potwierdzają działanie sacharozy jako negatywnego regulatora transkrypcji genu *WPK4* aktywowanej przez cytokininy.

Zainteresowanie badaczy wzbudza również zagadnienie udziału cukrów w regulacji genów α -amylazy w nasionach. Wykazano, że cukry nie wpływają na giberelinową indukcję α -amylazy w warstwie aleuronowej, natomiast hamują hormonalną aktywację ekspresji tego genu w zarodku [54,68].

Szczególnie interesujące wydają się wyniki badań świadczące o współdziałaniu cukrów i fitohormonów w regulacji cyklu komórkowego. Transkrypcja jednej z cyklin D (*CYCD4;1*), regulującej przejście z fazy G1 do S jest aktywowana przez sacharozę [14]. Wyniki najnowszych doświadczeń potwierdzają, że również ekspresja cyklin D2 i D3 jest regulowana przez glukozę, przy czym ekspresja cykliny D2 wydaje się być regulowana przez szlak zależny od heksokinazy [Murray JAH – doniesienie ustne].

Szlak sygnalizacji sacharozowej jest też powiązany ze szlakami sygnalizacji świetlnej. Świadczą o tym wyniki doświadczeń prowadzonych na mutancie *sun* (*sucrose uncoupled*), w których śledzono zmiany w represji sacharozowej genów regulowanych przez fitochromy, takich jak gen *PC* kodujący plastocyaninę i gen *CAB* [16].



RYCINA 8. Schemat glukozy szlaku sygnałowego regulującego w komórkach β trzustki ekspresję genu proinsuliny i sekrecję insuliny w pęcherzykach sekcyjnych (na podstawie [18,28,57,76,90])

SYGNALIZACJA CUKROWCOWA W KOMÓRKACH β TRZUSTKI I HEPATOCYTACH WĄTROBY SSAKÓW

Sygnalizacja cukrowcowa u ssaków była badana dotychczas głównie w odniesieniu do regulacji syntezy i sekrecji insuliny w komórkach β trzustki, a także regulowanej przez glukozę i insulinę ekspresji genów kodujących transportery glukozy oraz enzymy funkcjonujące w glikolizie i lipogenezie w komórkach wątroby [18,76,90]. Dzisiaj już wiadomo, że w komórkach β trzustki fosforylacja glukozy przez glukokinazę jest kluczowym miejscem w szlaku sygnałowym pozytywnej i negatywnej regulacji ekspresji genów [57]. Właściwości kinetyczne glukokinazy predysponują ten enzym do pełnienia funkcji sensora glukozy, w mechanizmie, w którym pewną nie do końca poznaną jeszcze rolę grają zmiany lokalizacji subkomórkowej enzymu [89]. W warunkach małego stężenia glukozy w hepatocytach wątroby glukokinaza łączy się w jądrze komórkowym z białkiem regulatorowym GKR (glucokinase regulatory protein). Kiedy jednak stężenie glukozy wzrasta, glukokinaza zostaje przetransportowana do cytoplazmy, gdzie następuje jej aktywacja [13]. W komórkach wątroby aktywacja glukokinazy jest uzależniona od jej defosforylacji, w której, jak się przypuszcza, uczestniczy cytoplazmatyczna fosfataza GKAP (glucokinase-associated phosphatase) [60].

Również w komórkach β trzustki glukokinaza oddziałuje z białkami regulatorowymi, a także z dwufunkcyjnym enzymem syntetyzującym i degradującym fruktozo-2,6-bisfosforan [2]. Funkcję sensorową glukokinazy potwierdzają również wyniki badań prowadzonych na myszach, u których geny glukokinazy zostały wyłączone w drodze mutacji [69].

Ostatnie doniesienia sugerują, że w odbiorze sygnału glukozowego uczestniczy również transporter GLUT2 zawierający stosunkowo dużą pętlę cytoplazmatyczną między 6 a 7 fragmentem transbłonowym (ryc. 8) [28]. Nadekspresja fragmentu genu *GLUT2* kodującego tę właśnie pętlę modyfikuje odpowiedź glukozową w komórkach wątroby [28].

W szlaku transdukcji sygnału glukozowego u ssaków, podobnie jak u drożdży i roślin, uczestniczy kompleks kinazy AMPK aktywowanej przez AMP (ryc. 8). Wykazano, że w komórkach β trzustki małe stężenie glukozy powoduje aktywację AMPK, której towarzyszy niska ekspresja genów cyklu lipogenetycznego. Duże stężenie glukozy inaktywuje AMPK, co w efekcie prowadzi do aktywacji genów lipogenezy [90]. Szereg wyników wskazuje również na kinazę białkową aktywowaną przez cAMP jako jedno z ogniw łańcucha sygnalizacji glukozowej. W glukozowej regulacji ekspresji genu insuliny uczestniczy czynnik transkrypcyjny PDX1 (*pancreatic duodenum homeobox protein*) zawierający homeodomenę (ryc. 8) [55,90]. Białko PDX1 fosforylowane w warunkach dużego stężenia glukozy przez kinazę białkową po przetransportowaniu do jądra wiązane jest przez sekwencję promotorową genu proinsuliny [55,90]. Poziom uwalnianej insuliny jest bezpośrednio zależny od metabolizmu glukozy oraz stanu energetycznego komórki. Wzrost stosunku ATP: ADP hamuje kanały potasowe wrażliwe na ATP prowadząc do depolaryzacji błony komórkowej i otwierania kanałów wapniowych. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} sprzyja fuzji pęcherzyków zawierających insulinę z błoną komórkową [76].

UWAGI KOŃCOWE

Bakterie, drożdże i organizmy wyższe dysponują specjalnymi mechanizmami umożliwiającymi rejestrowanie zmian zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego stężenia metabolitów azotu i węgla oraz indukowanie swoistych odpowiedzi w postaci zmian w ekspresji genów lub zmian aktywności białek uczestniczących w transporcie i metabolizmie tych związków. Mechanizm percepcji sygnału azotowego (aminokwasy, amoniak) został już stosunkowo dobrze poznany u *E. coli* i częściowo u drożdży. Wiedza na temat analogicznych mechanizmów uczestniczących w rejestrowaniu i przekazywaniu sygnału azotowego w organizmach wielokomórkowych jest jeszcze bardzo fragmentaryczna. Osiągnięcia w poznawaniu szlaków sygnalizacji cukrowcowej w komórkach bakterii i drożdży przyczyniły się do szybkiego rozwoju podobnych badań prowadzonych na organizmach wielokomórkowych. Dzisiaj już wiadomo, że w komórkach roślinnych glukoza oraz sacharoza pełnią funkcję cząstek sygnałowych

aktywujących kaskadę reakcji regulujących ekspresję genów. Rośnie również liczba doniesień potwierdzających udział glukozy w regulacji ekspresji genów w trzustce, wątrobie i mózgu ssaków.

Wiele wątpliwości i pytań rodzi się nadal w związku z poszukiwaniami wewnątrzkomórkowych sensorów glukozy. W komórkach organizmów wielokomórkowych, podobnie jak w drożdżach, funkcja ta przypisywana jest swoistym enzymom fosforylującym glukozę (heksokinaza, glukokinaza), chociaż mechanizm percepcji sygnału cukrowego przez te enzymy nie jest nadal znany. Dotychczasowe sugestie na ten temat nie zyskały szerszego potwierdzenia doświadczalnego i dlatego mechanizm ten jest obecnie przedmiotem badań wykorzystujących techniki biologii molekularnej.

Drożdżowe sensory glukozy zlokalizowane w błonie komórkowej (Snf3, Rgt2) wydają się funkcjonować podobnie jak receptory wiążące ligandy, chociaż typowym receptorem glukozy współdziałającym z białkiem G jest białko Gpr1, które podobnie jak receptory z rodziny R7TM posiada siedem charakterystycznych fragmentów transbłonowych. Wyniki poszukiwań sekwencji kodujących białka homologiczne z Snf3 i Rgt2 w genomach kilku roślin sugerują, że podobnych sensorów glukozy można się spodziewać również w organizmach wielokomórkowych. W genomie *A. thaliana* nie zidentyfikowano jednak sekwencji kodującej białko homologiczne z Gpr1.

Roślinne odpowiedzi na sygnały cukrowe aktywowane przez co najmniej trzy szlaki sygnalizacji glukozowej i odrębny szlak sacharozowy są niezwykle zróżnicowane. Rodzaj odpowiedzi na zmiany stężenia cukrów zależy m.in. od typu komórki, stanu metabolicznego, warunków rozwojowych i środowiskowych. W organizmach roślinnych cukrowe szlaki sygnałowe utworzone przez białka i enzymy homologiczne z białkami zidentyfikowanymi w drożdżach tworzą z innymi łańcuchami transdukcji sygnałów złożoną sieć informacyjną regulującą wszystkie procesy życiowe pojedynczej komórki i całego organizmu.

LITERATURA

- [1] ARENAS-HUERTERO F, ARROYO A, ZHOU L, SHEEN J, LEÓN P. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* 2000; **14**: 2085–2096.
- [2] BALTRUSCH S, LENZEN S, OKAR DA, LANGE AJ, TIEDGE M. Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *J Biol Chem* 2001; **276**: 43915–43923.
- [3] BARKER L, KÜHN C, WEISE A, SCHULZ A, GEBHARDT C, HIRNER B, HELLMANN H, SCHULZE W, WARD JM, FROMMER WB. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 2000; **12**: 1153–1164.
- [4] BHALERAJ RP, SALCHERT K, BAKÓ L, ÖKRÉSZ L, SZABADOS L, MURANAKA T, MACHIDA Y, SCHELL J, KONCZ C. Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5322–5327.
- [5] BOLES E, HOLLENBERG CP. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 1997; **21**: 85–111.

- [6] BOULY J-P, GISSOT L, LESSARD P, KREIS M, THOMAS M. *Arabidopsis thaliana* pro-teins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN α 1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J* 1999; **18**: 541–550.
- [7] CARLSON M. Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 1999; **2**: 202–207.
- [8] CARLSON M. Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 1998; **8**: 560–564.
- [9] CHAN M-T, YU S-M. The 3' untranslated region of a rice α -amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6543–6547.
- [10] CHIOU T-J, BUSH DR. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4784–4788.
- [11] CIERESZKO I. Regulacyjna rola cukrów. Percepcja cukrów i przekazywanie sygnału w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 269–289.
- [12] COLOMBO S, MA P, CAUWENBERG L, WINDERICKX J, CRAUWELS M, TEUNISSEN A, NA-UWELAERS D, DE WINDE JH, GORWA M-F, COLAVIZZA D, THEVELEIN JM. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1998; **17**: 3326–3341.
- [13] DE LA IGLESIA N, MUKHTAR M, SEOANE J, GUINOVART JJ, AGIUS L. The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J Biol Chem* 2000; **275**: 10597–10603.
- [14] DE VEYLDER L, DE ALMEIDA ENGLER J, BURSSSENS S, MANEVSKI A, LESCURE B, VAN MONTAGU M, ENGLER G, INZÉ D. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* 1999; **208**: 453–462.
- [15] DEVIT MJ, WADDLE JA, JOHNSTON M. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 1603–1618.
- [16] DIJKWEL PP, HUIJSER C, WEISBEEK PJ, CHUA N-H, SMEEKENS SCM. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1997; **9**: 583–595.
- [17] DŁUGAI S, HIPPLER S, WIECZORKE R, BOLES E. Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. *FEBS Lett* 2001; **505**: 389–392.
- [18] EFRAT S, TAL M, LODISH HF. The pancreatic β -cell glucose sensor. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 535–538.
- [19] EHNESS R, ECKER M, GODT DE, ROITSCH T. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 1997; **9**: 1825–1841.
- [20] FARRÁS R, FERRANDO A, JÁSİK J, KLEINOW T, ÖKRÉSZ L, TIBURCIO A, SALCHERT K, DEL POZO C, SCHELL J, KONCZ C. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J* 2001; **20**: 2742–2756.
- [21] FORDHAM-SKELTON AP, CHILLEY P, LUMBRERAS V, REIGNOUX S, FENTON TR, DAHM CC, PAGES M, GATEHOUSE JA. A novel higher plant protein tyrosine phosphatase interacts with SNF1-related protein kinases via a KIS (kinase interaction sequence) domain. *Plant J* 2002; **29**: 705–715.
- [22] FORSBERG H, LJUNGDAHL PO. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2001; **40**: 91–109.
- [23] FURUICHI T, MORI IC, TAKAHASHI K, MUTO S. Sugar-induced increase in cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* whole plants. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 1149–1155.
- [24] GANCEDO JM. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62**: 334–361.
- [25] GAZZARRINI S, MCCOURT P. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 387–391.
- [26] GIBSON SI. Plant sugar-response pathways. Part of complex regulatory web. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1532–1539.
- [27] GIBSON SI, LABY RJ, KIM D. The sugar-insensitive (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **280**: 196–203.
- [28] GUILLEMAIN G, LOIZEAU M, PINÇON-RAYMOND M, GIRARD J, LETURQUE A. The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. *J Cell Sci* 2000; **113**: 841–847.
- [29] HALFORD NG, HARDIE DG. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* 1998; **37**: 735–748.

- [30] HALFORD NG, PURCELL PC, HARDIE DG. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends Plant Sci* 1999; 4: 117–120.
- [31] HARDIE DG, CARLING D, CARLSON M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 821–855.
- [32] HERBERS K, MEUWLY P, FROMMER WB, MÉTRAUX J-P, SONNEWALD U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 1996; 8: 793–803.
- [33] HERRERO P, MARTINEZ-CAMPA C, MORENO F. The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1998; 434: 71–76.
- [34] HO S-L, CHAO Y-C, TONG W-F, YU S-M. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol* 2001; 125: 877–890.
- [35] HOHMANN S, WINDERICKX J, DE WINDE JH, VALCKX D, COBBAERT P, LUYTEN K, DE MEIRSMAN C, RAMOS J, THEVELEIN JM. Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of *SUC2*. *Microbiology* 1999; 145: 703–714.
- [36] HUIJSER C, KORTSTEE A, PEGO J, WEISBEEK P, WISMAN E, SMEEKENS S. The *Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J* 2000; 23: 577–585.
- [37] IKEDA Y, KOIZUMI N, KUSANO T, SANO H. Sucrose and cytokinin modulation of *WPK4*, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from wheat. *Plant Physiol* 1999; 121: 813–820.
- [38] IWATA Y, KURIYAMA M, NAKAKITA M, KOJIMA H, OHTO M-A, NAKAMURA K. Characterization of a calcium-dependent protein kinase of tobacco leaves that is associated with the plasma membrane and is inducible by sucrose. *Plant Cell Physiol* 1998; 39: 1176–1183.
- [39] JAKUBOWSKA A, KOWALCZYK S. Kwas abscysynowy – percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 2000; 27: 633–656.
- [40] JANG J-C, LEÓN P, ZHOU L, SHEEN J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 1997; 9: 5–19.
- [41] JANG J-C, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci* 1997; 2: 208–214.
- [42] JIANG H, TATCHELL K, LIU S, MICHELS CA. Protein phosphatase type-1 regulatory subunits Reg1p and Reg2p act as signal transducers in the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 2000; 263: 411–422.
- [43] JOHNSTON M. Feasting, fasting and fermenting glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 1999; 15: 29–33.
- [44] KISHI T, SENO T, YAMAO F. Grr1 functions in the ubiquitin pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through association with Skp1. *Mol Gen Genet* 1998; 257: 143–148.
- [45] KLEIN CJL, OLSSON L, NIELSEN J. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of *MIG1* in metabolic functions. *Microbiology* 1998; 144: 13–24.
- [46] KOCH KE, YING Z, WU Y, AVIGNE WT. Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *J Exp Bot* 2000; 51: 417–427.
- [47] KOWALCZYK S, JAKUBOWSKA A. Receptory etylenu, cytokinin i brasinosteroidów – transmembranowymi kinazami białkowymi? *Post Biol Kom* 1999; 26: 3–32.
- [48] KRAAKMAN L, LEMAIRE K, MA P, TEUNISSEN AWRH, DONATON MCV, VAN DIJCK P, WINDERICKX J, DE WINDE JH, THEVELEIN JM. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* 1999; 32: 1002–1012.
- [49] KRUCKEBERG AL., WALSH MC, VAN DAM K. How do yeast cells sense glucose? *BioEssays* 1998; 20.12: 972–976.
- [50] LABY RJ, KINCAID S, KIM D, GIBSON SI. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* 2000; 23: 587–596.
- [51] LAKATOS L, KLEIN M, HÖFGEN R, BÁNFALVI Z. Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant J* 1999; 17: 569–574.
- [52] LALONDE S, BOLES E, HELLMANN H, BARKER L, PATRICK JW., FROMMER WB, WARD JM. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* 1999; 11: 707–726.

- [53] LI FN, JOHNSTON M. *Grr1* of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J* 1997; **16**: 5629–5638.
- [54] LORETI E, MATSUKURA C-A, GUBLER F, ALPI A, YAMAGUCHI J, PERATA P. Glucose repression of α -amylase in barley embryos is independent of *GAMYB* transcription. *Plant Mol Biol* 2000; **44**: 85–90.
- [55] MACFARLANE WM, SHEPHERD RM, COSGROVE KE, JAMES RFL, DUNNE MJ, DOCHERTY K. Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca^{2+} . *Diabetes* 2000; **49**: 418–423.
- [56] MAEO K, TOMIYA T, HAYASHI K, AKAIKE M, MORIKAMI A, ISHIGURO S, NAKAMURA K. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for β -amylase of sweet potato. *Plant Mol Biol* 2001; **46**: 627–637.
- [57] MATSCHINSKY FM, GLASER B, MAGNUSON MA. Pancreatic β -cell glucokinase. Closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* 1998; **47**: 307–315.
- [58] MITA S, HIRANO H, NAKAMURA K. Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for β -amylase. *Plant Physiol* 1997; **114**: 575–582.
- [59] MITA S, MURANO N, AKAIKE M, NAKAMURA K. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J* 1997; **11**: 841–851.
- [60] MUÑOZ-ALONSO MJ, GUILLEMAIN G, KASSIS N, GIRARD J, BURNOL A-F, LETURQUE A. A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *J Biol Chem* 2000; **275**: 32406–32412.
- [61] NÉMETH K, SALCHERT K, PUTNOKY P, BHALERAO R, KONCZ-KÁLMÁN Z, STANKOVIC-STANGELAND B, BAKÓ L, MATHUR J, ÖKRÉSZ L, STABEL S, GEIGENBERGER P, STITT M, RÉDEI GP, SCHELL J, KONCZ C. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 1998; **12**: 3059–3073.
- [62] OHBA H, STEWARD N, KAWASAKI S, BERBERICH T, IKEDA Y, KOIZUMI N, KUSANO T, SANO H. Diverse response of rice and maize genes encoding homologs of WPK4, an SNF1-related protein kinase from wheat, to light, nutrients, low temperature and cytokinins. *Mol Gen Genet* 2000; **263**: 359–366.
- [63] ÖSTLING J, RONNE H. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur J Biochem* 1998; **252**: 162–168.
- [64] ÖZCAN S, DOVER J, JOHNSTON M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1998; **17**: 2566–2573.
- [65] ÖZCAN S, JOHNSTON M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; **63**: 554–569.
- [66] PATTON EE, WILLEMS AR, TYERS M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet* 1998; **14**: 236–243.
- [67] PEGO JV, KORTSTEE AJ, HUIJSER C, SMEEKENS SCM. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 2000; **51**: 407–416.
- [68] PERATA P, MATSUKURA C, VERNIERI P, YAMAGUCHI J. Sugar repression of a gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *Plant Cell* 1997; **9**: 2197–2208.
- [69] POSTIC C, SHIOTA M, NISWENDER KD, JETTON TL, CHEN Y, MOATES JM, SHELTON KD, LINDNER J, CHERRINGTON AD, MAGNUSON MA. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knockouts using cre recombinase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 305–315.
- [70] PURCELL PC, SMITH AM, HALFORD NG. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J* 1998; **14**: 195–202.
- [71] RANDEZ-GIL F, HERRERO P, SANZ P, PRIETO JA, MORENO F. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1998; **425**: 475–478.
- [72] RANDEZ-GIL F, SANZ P, ENTIAN K-D, PRIETO JA. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 2940–2948.
- [73] ROITSCH T. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 198–206.
- [74] ROLLAND F, MOORE B, SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 2002; Supplement: S185–S205.

- [75] ROLLAND F, DE WINDE JH, LEMAIRE K, BOLES E, THEVELEIN JM, WINDERICKX J. Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* 2000; **38**: 348–358.
- [76] ROLLAND F, WINDERICKX J, THEVELEIN JM. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 310–317.
- [77] ROOK F, GERRITS N, KORTSTEE A, VAN KAMPEN M, BORRIAS M, WEISBEEK P, SMEEKENS S. Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene. *Plant J* 1998; **15**: 253–263.
- [78] SCHOUTEN J, DE KAM RJ, FETTER K, HOGE JHC. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* SKP1 homologs in yeast inactivates the Mig 1 repressor by destabilizing the F-box protein Grr1. *Mol Gen Genet* 2000; **263**: 309–319.
- [79] SHEEN J, ZHOU L, JANG J-C. Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 410–418.
- [80] SMEEKENS S, ROOK F. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol* 1997; **115**: 7–13.
- [81] SMEEKENS S. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 49–81.
- [82] SPRAGUE ER, REDD MJ, JOHNSON AD, WOLBERGER C. Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J* 2000; **19**: 3016–3027.
- [83] SUGDEN C, CRAWFORD RM, HALFORD NG, HARDIE DG. Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J* 1999; **19**: 433–439.
- [84] THELANDER M, FREDRIKSSON D, SCHOUTEN J, HOGE JHC, RONNE H. Cloning by pathway activation in yeast: identification of an *Arabidopsis thaliana* F-box protein that can turn on glucose repression. *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 69–79.
- [85] THEVELEIN JM, DE WINDE JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 1999; **33**: 904–918.
- [86] TOROSER D, PLAUT Z, HUBER S.C. Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol* 2000; **123**: 403–411.
- [87] VAGNOLI P, COONS DM, BISSON LF. The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **160**: 31–36.
- [88] VANHALEWYN M, DUMORTIER F, DEBAST G, COLOMBO S, MA P, WINDERICKX J, VAN DIJCK P, THEVELEIN JM. A mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, Cyl1^{K1876M}, specifically affects glucose- and acidification-induced cAMP signalling and not the basal cAMP level. *Mol Microbiol* 1999; **33**: 363–376.
- [89] VANHOUTTE C, MALAISSE WJ. Energy-dependent intracellular translocation of glucokinase in rat pancreatic islets. *Mol Genet Metab* 1998; **63**: 176–182.
- [90] VAULONT S, VASSEUR-COGNET M, KAHN A. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000; **275**: 31555–31558.
- [91] VERSELE M, DE WINDE JH, THEVELEIN JM. A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J* 1999; **18**: 5577–5591.
- [92] VITRAÇ X, LARRONDE F, KRISA S, DECENDIT A, DEFFIEUX G, MÉRILLON J-M. Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* 2000; **53**: 659–665.
- [93] WINGLER A, VON SCHAEWEN A, LEEGOOD RC, LEA PJ, QUICK WP. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. *Plant Physiol* 1998; **116**: 329–335.
- [94] WOBUS U, WEBER H. Sugar as signal molecules in plant seed development. *Biol Chem* 1999; **380**: 937–944.
- [95] XIAO W, SHEEN J, JANG J-C. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol* 2000; **44**: 451–461.
- [96] XUE Y, BATLLE M, HIRSCH JP, *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G_α subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J* 1998; **17**: 1996–2007.
- [97] YU S-M. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol* 1999; **121**: 687–693.

- [98] YUN C-W, TAMAKI H, NAKAYAMA R, YAMAMOTO K, KUMAGAI H. Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **252**: 29–33.
- [99] ZHOU L, JANG J-C, JONES TL, SHEEN J. Glucose and ethylene signal transduction cross-talk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10294–10299.
- [100] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 19.03.2002 r.

Przyjęto: 03.09.2002 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

MECHANIZMY INDUKCJI APOPTOZY I ZASTOSOWANIE TRAIL W TERAPII NOWOTWORÓW

TRAIL – APOPTOSIS INDUCTION MECHANISMS
AND ITS EMPLOYMENT IN CANCER THERAPY.

Paweł MRÓZ¹, Izabela MŁYNARCZUK^{1,2}

¹Zakład Immunologii oraz ²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) jest nowo odkrytą cytokiną zdolną indukować apoptozę w komórkach nowotworowych i wykazującą niewielką toksyczność wobec komórek niestransformowanych. TRAIL może indukować apoptozę jako rozpuszczalny trimeryczny ligand lub jako cząsteczka związana na powierzchni komórki efektorowej. TRAIL indukuje proces apoptozy wiążąc się ze swoimi receptorami na powierzchni komórki docelowej (TRAIL-R1 i TRAIL-R2). Trzy inne receptory dla TRAIL (TRAIL-R3, TRAIL-R4 i OPG) są receptorami kotwiczącymi, których ligacja nie przewodzi sygnału do apoptozy. Spośród przebadanych linii komórkowych, 60% komórek nowotworowych wykazuje wrażliwość na apoptozę indukowaną TRAIL. Dlatego TRAIL jest zaliczany do grupy obiecujących leków w terapii nowotworów.

Słowa kluczowe: TRAIL, TNF, apoptoza, terapia nowotworów, kaspazy.

Summary: TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) is a newly discovered cytokine able to induce apoptosis in tumor cells with a limited cytotoxicity to most of normal cells. TRAIL can induce apoptosis as a soluble, trimeric ligand or it can be absorbed on effector cells membrane. TRAIL mediates cell death binding to its receptors on cell surface (TRAIL-R1 and TRAIL-R2). The other TRAIL receptors, TRAIL-R3, TRAIL-R4 and OPG are decoy receptors, unable to induce apoptosis. Approximately 60% of examined tumor cells are sensitive to TRAIL mediated cell death. Thus TRAIL is a potential and promising candidate for cancer therapy.

Key words: TRAIL, TNF, apoptosis, cancer therapy, caspase.

1. WSTĘP

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki jest wrodzonym mechanizmem, za pomocą którego organizm eliminuje niechciane komórki. Apoptoza jest najbardziej rozpowszechnioną fizjologiczną formą śmierci komórek i pojawia się podczas embriogenezy, przebudowy tkanek, regulacji immunologicznej i w rozroście nowotworowym. Istnieje wiele czynników wywołujących apoptozę, do których zaliczamy m.in. cząsteczki nadrodziny czynnika martwicy nowotworów, granzyminy, jony wapnia, ceramidy i wolne rodniki, cytostatyki oraz promieniowanie jonizujące lub UV.

Jakiegokolwiek zaburzenia w kontroli programowanej śmierci komórek mogą prowadzić do rozwoju szeregu chorób w tym nowotworów, chorób autoimmunizacyjnych czy degeneracyjnych, czego przykładem może być choroba Alzheimera.

Przekazywanie sygnału apoptozy przebiega różnorodnymi, niezależnymi szlakami, które są pobudzane zarówno przez procesy zachodzące wewnątrz komórek, jak i przez zjawiska zachodzące w środowisku zewnętrznym, np. związanie ligandu z „receptorem śmierci” „Receptory śmierci” zostały zidentyfikowane jako grupa należąca do nadrodziny receptorów dla czynnika martwicy nowotworów (TNF). Ich główną funkcją jest indukcja apoptozy. Receptory te charakteryzują się posiadaniem wewnątrzkomórkowego regionu zwanego „domeną śmierci” (DD), która jest niezbędna do transmisji sygnału do wnętrza komórki. Obecnie znanych jest pięć funkcjonalnych, receptorów śmierci: TNF-receptor 1, CD95 / Fas / Apo1R, TRAIL R1, TRAIL R2 i Apo3R. Zasada transmisji sygnału do apoptozy jest w przypadku tych receptorów podobna. Związanie receptora z ligandem prowadzi do jego oligomeryzacji, a następnie do rekrutacji białek adaptorowych do domeny śmierci. Następnie białka adaptorowe aktywują kaspazy łącząc w ten sposób sygnał pochodzący z receptora śmierci z wewnątrzkomórkowymi szlakami apoptozy.

Jednym z ligandów dla receptorów śmierci, który ze względu na swoje właściwości wzbudza zainteresowanie w świecie naukowców, jest odkryty w 1995 roku nowy czynnik indukujący apoptozę – TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand*) [1]. Odkrycie tej cytokiny z rodziny TNF jest efektem poszukiwania homologów TNF obdarzonych najmniejszą toksycznością i największą zdolnością do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych.

Po raz pierwszy TRAIL został zidentyfikowany przy użyciu programu komputerowego i zsyntetyzowany w probówce. Dopiero wtórnie okazało się, że TRAIL występuje powszechnie w organizmie żywym, zarówno w postaci rozpuszczalnej jak i związany z powierzchnią komórki [2]. Jednak aktywność biologiczna naturalnie występującego TRAIL jest bardzo niska. TRAIL, który jest uwalniany do płynu tkankowego, ma zazwyczaj postać monomeru zbudowanego z jednego łańcucha białkowego i nie pobudza tak efektywnie receptorów na powierzchni komórki docelowej jak jego trimeryczna forma. Dopiero trimeryzacja rozpuszczalnej formy TRAIL daje najsilniejszy efekt indukcji apoptozy [3].

TRAIL może indukować apoptozę na dwa sposoby:

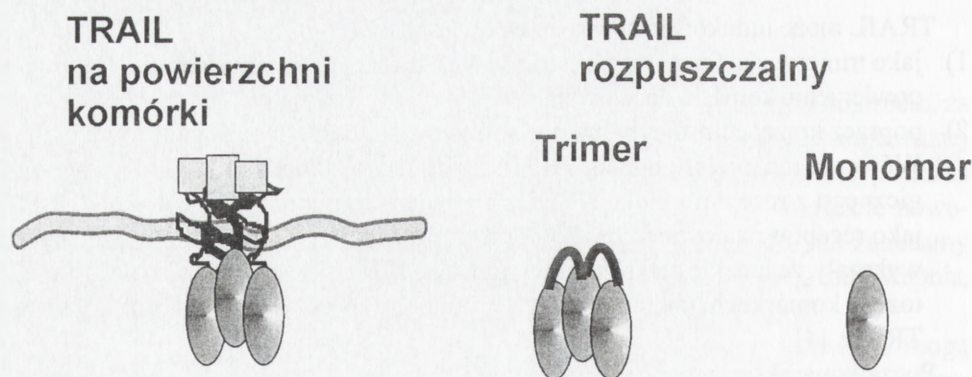
- 1) jako trimeryczna forma rozpuszczalna wiążąc receptor mający domenę śmierci na powierzchni komórki docelowej;
- 2) poprzez krążące limfocyty lub makrofagi mające TRAIL na swojej powierzchni. Wówczas ma miejsce ligacja TRAIL związanego z komórką układu immunologicznego z receptorem dla TRAIL na powierzchni komórki docelowej. TRAIL jako receptor na powierzchni komórki też jest trimeryczny (ryc. 1). Doświadczenia wykazały, że ludzkie makrofagi stymulowane IFN alfa i gamma indukowały apoptozę w komórkach nowotworowych w podobny sposób jak rozpuszczalny trimer TRAIL [4].

Początkowe eksperymenty wykazały, że TRAIL ma zdolność selektywnej indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych, gdyż wywołuje apoptozę u ok. 60% komórek szeregu linii nowotworowych [3, 5, 6], ale jest nietoksyczny dla niestransformowanych komórek [7]. Okoliczność ta stawia TRAIL w szeregu obiecujących czynników użytecznych w terapii nowotworów. Badania na naczelnych nie wykazały toksyczności TRAIL podawanego dożylnie [8]. Jednak ostatnio wykazano, że ludzkie normalne astrocyty, hepatocyty, tymocyty, komórki nabłonka tarczycy i prostaty mogą być wrażliwe na apoptozę wywołaną TRAIL [9–12]. Dlatego wiedza o roli fizjologicznej TRAIL u ludzi byłaby przydatna w ustaleniu potencjalnych czynników ryzyka związanych z wprowadzeniem TRAIL do terapii nowotworów.

2. BUDOWA I WYSTĘPOWANIE TRAIL

TRAIL został opisany jako cząsteczka nadrodziny czynnika martwicy nowotworów i jest przezbłonową cząsteczką typu II wykazującą znaczną homologię do CD95L, dzieląc z nim 28% aminokwasów budujących zewnątrzkomórkowy motyw wiążący się z receptorem. W przeciwieństwie jednak do pozostałych członków rodziny TNF TRAIL ma bardzo krótką domenę wewnątrzkomórkową zawierającą tylko 17 aminokwasów. Monomer TRAIL zawiera dwie przeciwrównoległe struktury o konformacji β tworzące strukturę β -kartki będącą rodzajem zřębu i podjednostki wzajemnie oddziałujące na siebie na zasadzie głowa-ogon, tworzące dzwonowatego kształtu homotrimer [13]. Monomer TRAIL, w swej części wiążącej receptor, zawiera pojedynczą cysteinę, Cys 230. Jest ona niezbędna do optymalnej aktywności TRAIL i stabilizacji jego trimerycznej struktury [1, 3].

TRAIL jest powszechnie obecny w tkankach. Ekspresję mRNA dla TRAIL i jego receptorów stwierdza się w większości niestransformowanych komórek organizmu i komórek nowotworowych [2, 14, 15]. Istnieją jedynie różnice w dystrybucji receptorów dla TRAIL na powierzchni komórki, co jest związane z różną wrażliwością komórek na działanie TRAIL. Uważa się, że TRAIL nie wykazuje specyficzności gatunkowej i jest skuteczny w eksperymentach zarówno na mysich liniach komórkowych, jak i na ludzkich [7]. Ludzki gen dla TRAIL znajduje się na chromosomie 3q26, a jego mRNA



RYCINA 1. TRAIL może występować jako receptor na powierzchni komórki albo jako forma rozpuszczalna: monomer lub trimer

znaleziono w spoczynkowych limfocytach T ($CD4^+$ jak i $CD8^+$), monocytach, granulocytach, komórkach NK i komórkach dendrytycznych [16,17]. Mimo powszechnej obecności w tkankach, fizjologiczna rola TRAIL jest słabo poznana, a myszy z nieaktywnym genem dla TRAIL mają prawidłowy fenotyp. Przypuszcza się, że TRAIL odgrywa rolę w procesach immunologicznych. Wykazano, że TRAIL może indukować apoptozę w zdrowych komórkach nabłonka tarczycy i uczestniczyć w patogenezie autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy. [18]. Opisywano też udział TRAIL w selekcji negatywnej tymocytów [19]. Tymocyty ulegające selekcji mają wysoką ekspresję receptorów pośredniczących w szlaku aktywacji apoptozy (TRAIL-R1 i TRAIL-R2).

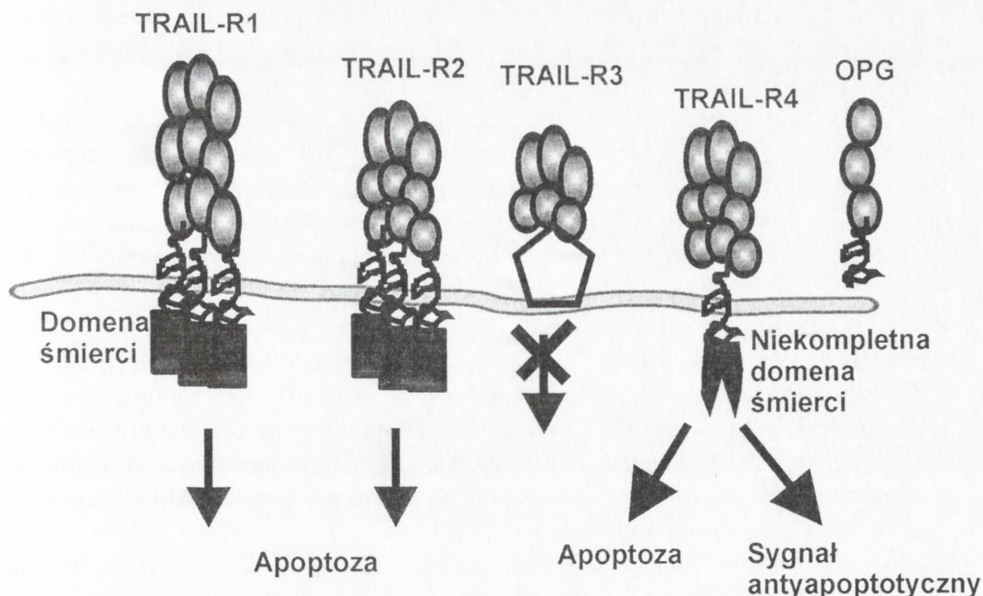
3. TRANSMISJA SYGNAŁU I RECEPTORY DLA TRAIL

Do niedawna szlaki transmisji sygnału do apoptozy pod wpływem związania TRAIL z receptorem budziły wiele kontrowersji wywołanych przede wszystkim odmiennymi modelami doświadczeń i nawet sprzecznymi wynikami.

Dotychczas zidentyfikowano pięć receptorów wchodzących w interakcje z TRAIL (ryc. 2). Są to:

- TRAIL R1 (DR4/Apo2 A)
- TRAIL R2 (DR5/TRICK/KILLER)
- TRAIL R3 (DcR1/TRID/LIT)
- TRAIL R4 (DcR2/TRUND)
- Osteoprotegeryna (OPG)

Receptory TRAIL-R1 i TRAIL-R2 zawierają wewnątrzkomórkową domenę śmierci (DD) niezbędną do indukcji apoptozy po przyłączeniu TRAIL. Natomiast receptory TRAIL-R3 i TRAIL-R4 nie przekazują sygnału do apoptozy, odpowiednio ze względu na całkowity lub częściowy brak wewnątrzkomórkowej domeny śmierci.



RYCINA 2. TRAIL może wiązać pięć swoich receptorów. Dwa z nich indukują wyłącznie sygnał do apoptozy (TRAIL-R1 i TRAIL-R2), dwa inne receptory są pułapką dla TRAIL i nie przewodzą żadnego sygnału (TRAIL-R3 i OPG), natomiast TRAIL-R4 może jednocześnie indukować sygnał do apoptozy, jak i sygnał antyapoptotyczny: OPG – osteoprotegeryna.

TRAIL R1 – jest pierwszym opisanym receptorem dla TRAIL. Jest przezbłonowym białkiem typu I mającym zewnątrzkomórkowy region charakteryzujący się obecnością dwóch bogatych w cysteinę pseudopowtórzeń. Jego wewnątrzkomórkowy region zawiera kompletną i funkcjonalną domenę śmierci homologiczną do innych domen pozostałych cząsteczek nadrodziny receptorów dla TNF. Sugeruje się istnienie, dodatkowej, nieznannej drogi przekazywania sygnału do apoptozy poprzez ten receptor [15, 20].

TRAIL R2 – ma strukturę bardzo podobną do TRAIL R1. Jest również białkiem powierzchniowym typu I należącym do nadrodziny receptorów dla TNF. Region zewnątrzkomórkowy zawiera dwie domeny bogate w cysteinę, a region wewnątrzkomórkowy charakteryzuje się obecnością domeny śmierci. Ten receptor pośredniczy w przekazaniu sygnału do apoptozy wyłącznie drogą zależną od mitochondrium i kaspaz [15, 21–23].

TRAIL R3 – jest trzecim białkiem związanym z błoną, wiążącym z dużym powinowactwem TRAIL. Jego domena zewnątrzkomórkowa ma budowę podobną do wyżej opisanych, ale w przeciwieństwie do poprzednich receptorów nie ma on domeny cytoplazmatycznej. Jest związany z powierzchnią błony komórkowej za pomocą glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Natomiast domena wiążąca TRAIL jest oddzielona od regionu przezbłonowego przez 88-aminokwasowy łącznik zawierają-

cy powtórzenia 4 aminokwasów (Thr, Ala, Pro, Glu). W przeciwieństwie do dwóch poprzednich receptorów TRAIL R3 (DcR1) nie może przekazać do komórki sygnału do apoptozy [21, 24].

TRAIL R4 – jest klasycznym białkiem przezbłonowym typu I, z regionem zewnątrzkomórkowym bogatym w cysteinę i homologią 58–70% z pozostałymi receptorami. Natomiast C-końcowy odcinek domeny cytoplazmatycznej jest pozbawiony 52 z 76 aminokwasów budujących domenę śmierci. Wobec tego, podobnie jak TRAIL R3 nie może on przekazać sygnału do apoptozy po związaniu TRAIL [24].

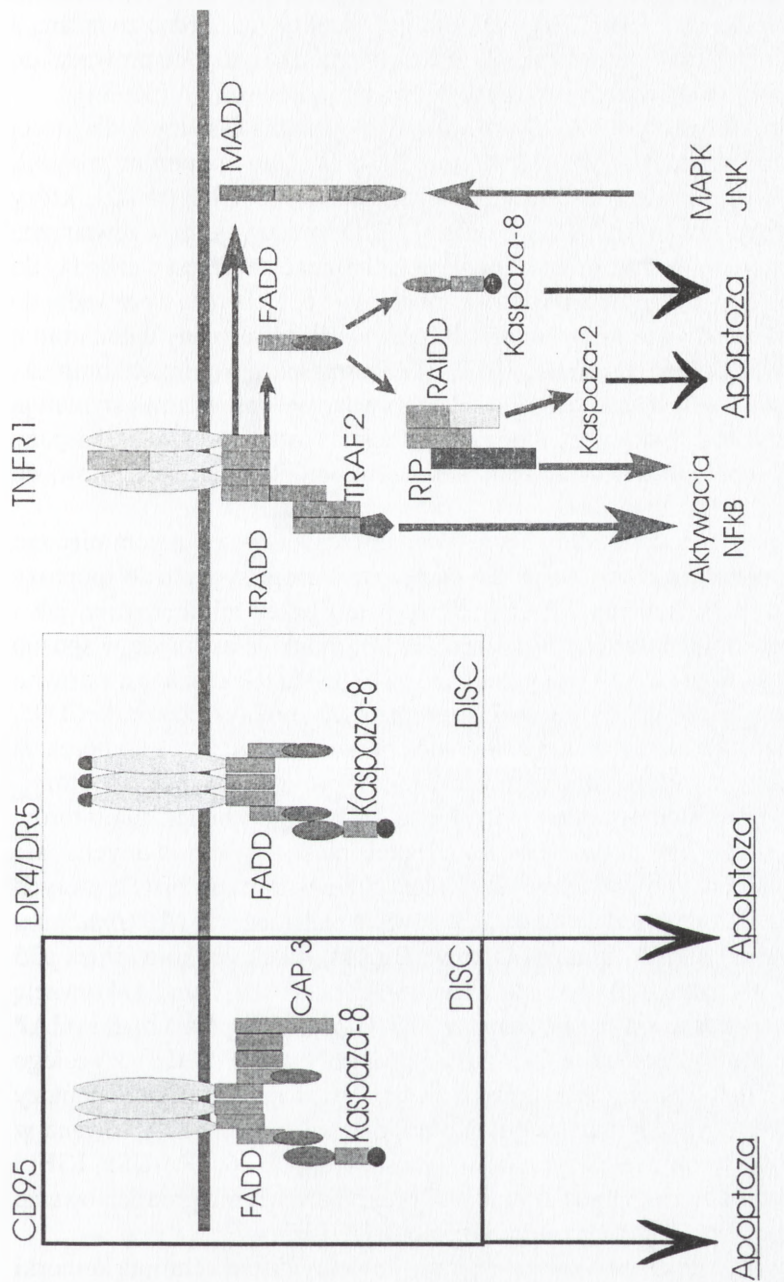
OPG – jest rozpuszczalnym receptorem występującym w osoczu należącym do nadrodziny receptorów dla TNF. Częsteczka ta zmniejsza resorpcję kości przez hamowanie osteoklastogenezy, a jej nadekspresja prowadzi do splenomegalii. Ma własne ligandy, takie jak OPGL (RANKL, TRANCE), a ponadto udowodniono, że może wiązać TRAIL. Jednak będąc receptorem niezwiązanym z błoną nie ma domeny śmierci i nie przekazuje sygnału do apoptozy. Jej rola w kontekście wiązania TRAIL pozostaje niewyjaśniona [25].

Geny dla czterech pierwszych receptorów (TRAIL-R1, -R2, -R3, -R4) są zlokalizowane blisko siebie i znajdują się na chromosomie 8p21, sugerując, że mogły powstać z jednego prekursora w procesie duplikacji genów, co wyjaśniałoby ich wysoką homologię, natomiast gen dla OPG znajduje się również na chromosomie 8, ale na ramieniu q w pozycji 23–24 [26].

4. WEWNĄTRZKOMÓRKOWE MECHANIZMY INDUKCJI APOPTOZY ZALEŻNEJ OD TRAIL

Przyłączenie TRAIL do DR4 lub DR5 prowadzi do rekrutacji białka adaptorowego FADD/Mort1 (*Fas Associated Death Domain*) związanego z kaspazą 8. Rola FADD w transmisji sygnału apoptozy była swego czasu kwestionowana [15], ale wydaje się obecnie, że właśnie ta cząsteczka związana jest z indukcją apoptozy przez TRAIL [27–29]. Niemniej jednak komórki pozbawione FADD ulegają apoptozie pod wpływem TRAIL prawdopodobnie wykorzystując inną, FADD-podobną cząsteczkę adaptorową [30]. FADD zawiera na swoim C-końcu domenę śmierci, która umożliwia jej interakcję z domeną śmierci receptora, natomiast na N-końcu znajduje się domena efektorowa śmierci (DED), która łączy się z podobną DED zlokalizowaną w cząsteczce prokaspazy 8. Cały ten kompleks białek nazywany jest DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) (ryc. 3) [31].

Kaspazy są grupą proteaz bogatych w cysteinę. Dotychczas odkryto 11 izoform ludzkich. Są syntetyzowane jako zymogeny, a całkowicie aktywne mają postać heterotetramerów złożonych z dwóch identycznych podjednostek o masie ~20 kDa i dwóch o masie ~10 kDa. Pod wpływem sygnału do apoptozy są aktywowane



RYCINA 3. Porównanie wewnątrzkomórkowych szlaków prowadzących do apoptozy dla TRAIL, CD95 i TNF. Powstawanie kompleksu DISC zostało do tej pory udowodnione tylko w przypadku receptorów CD95 oraz DR4 i DR5. Również bezpośrednie interakcje między domeną FADD i TNF-R1 nie zostały udowodnione, natomiast w przypadku pozostałych trzech receptorów FADD jest nieodzownym elementem: FADD – *Fas Associated Death Domain*, TRADD – *TNF Receptor Associated Death Domain containing protein*, RIP – *Receptor Interacting Protein*, RAIDD – *RIP-Associated protein with a Death Domain*, MADD – *MAP kinase Activating Death Domain*, JNK – *Jun K-terminal kinase*

proteolitycznie, zarówno w procesie autoaktywacji, transaktywacji, jak i cięcia przez inne kaspazy. Aktywne kaspazy tną i inaktywują niezbędne dla życia enzymy, takie jak enzymy reperujące DNA, inhibitor p53 czy kinazę białkową Cd. Aktywują również DNazę CAD (*Caspase-Activated-DNase*), która jest nieaktywna, będąc związaną z inhibitorem iCAD. Podczas apoptozy iCAD jest cięty przez kaspazy, co prowadzi do uwolnienia aktywnej endonukleazy niszczącej wewnątrzjądro DNA [32–34].

Przyłączenie prokaspazy 8 do FADD prowadzi do powstania kaspazy 8, dla której substratem jest m.in. białko BID (*Bcl-2 Inhibitory BH-3 Domain-containing protein*). Cięcie białka BID prowadzi do powstania fragmentu p15 BID (tBID), który przemieszcza się do mitochondrium [35]. Białko p15 BID wbudowuje się w zewnętrzną błonę mitochondrium prowadząc do uwolnienia cytochromu c. tBID jest niezbędny do uwolnienia cytochromu c z mitochondrium, a uwolnienie cytochromu c prowadzi do spadku potencjału błonowego mitochondrium ($\Delta\Psi_m$) [34]. Uwolniony cytochrom c wchodzi w interakcję z białkiem Apaf1, dATP/ATP i prokaspazą 9 tworząc kompleks o nazwie apoptosom. Cytochrom c i dATP/ATP odgrywają rolę kofaktorów i stymulują Apaf1 do oligomeryzacji. Prokaspaza 9 ulega aktywacji, a następnie aktywuje kaspazy efektorowe 3 i 7. Tną one wiele różnych wewnątrzkomórkowych substratów, co prowadzi bezpośrednio do apoptozy.

Kaspaza 3 może być bezpośrednio aktywowana przez kaspasę 8 z pominięciem drogi zależnej od mitochondrium. Kaspaza 8 łączy zatem drogę sygnału do apoptozy przekazywanego z pobudzonych TRAIL-DR zarówno przez mitochondria, jak i bezpośrednio przez kaskadę kaspaz. Tak więc TRAIL indukuje apoptozę w sposób identyczny jak cząsteczka CD95 i jej ligand (ryc. 4). O ile jednak znana jest zarówno funkcja fizjologiczna, jak i fakt toksyczności dla normalnych komórek cząsteczki CD95, o tyle cały czas pozostaje niewyjaśniony fenomen oporności normalnych komórek na TRAIL, przy wykorzystywaniu takich samych szlaków prowadzących do apoptozy.

Próbuje się wyjaśnić ten fenomen poszukując na przykład białek inhibitorów apoptozy, które mogą być aktywne w komórkach niestransformowanych, ale nieaktywne w komórkach nowotworowych. Zidentyfikowano wiele białek, których główną funkcją jest obrona przed apoptozą. Zaliczyć do nich możemy IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*), CrmA, kinazę białkową B (Akt), białko bakulowirusa p35 oraz Bcl-2 i Bcl-X_L. Ludzkie IAP, takie jak: XIAP, c-IAP1 i c-IAP2, hamują aktywację kaspazy 9 lub bezpośrednio aktywację kaspazy 3 i 7. Otóż nadekspresja białka XIAP spowodowała zahamowanie aktywacji kaspazy 3 pod wpływem TRAIL, jak i całego procesu apoptozy [29]. Również nadekspresja CrmA czy p35 hamuje indukcję apoptozy pod wpływem TRAIL [29]. Kinaza serynowo/treoninowa Akt jest aktywowana w komórce w odpowiedzi na wiele czynników wzrostu (IL-3, IL-6, GM-CSF, IGF) i uczestniczy w obronie komórki przed czynnikami ją uszkodzającymi (promieniowanie UV, zaburzenia cyklu komórkowego, uszkodzenie DNA) [36].

Geny Bcl-2 i Bcl-X_L zlokalizowane są w błonie mitochondrium i chronią komórki nowotworowe przed indukcją apoptozy w drodze zależnej od mitochondrium. Otóż nadekspresja tych białek w komórkach linii Jurkat hamowała indukcję apoptozy przez TRAIL w sposób zależny od dawki w czasie 24 h. Jeśli jednak komórki były inkubowane

dłużej, nadekspresja tych białek jedynie obniżała, ale nie hamowała indukcji apoptozy pod wpływem TRAIL. Równocześnie nadekspresja tych białek kompletnie hamowała apoptozę indukowaną etoposidem [29]. W przypadku linii MCF-7 mającej oba typy receptorów śmierci dla TRAIL, nadekspresja obu genów obniżała, ale nie hamowała apoptozy. Doświadczenia te potwierdzają tezę, że TRAIL może indukować apoptozę w drodze zależnej i niezależnej od mitochondriów. Stwarza to szerokie możliwości wykorzystania TRAIL w terapii nowotworów zwłaszcza tych, w których obserwuje się nasiloną ekspresję białek Bcl-2 i Bcl-X_L.

Wiele kontrowersji budził fakt aktywacji przez TRAIL czynnika NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*). Białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym się z DNA i uczestniczącym w transkrypcji wielu genów zaangażowanych w proliferację komórek, np. genów dla cytokin i ich receptorów. Odgrywa również znaczącą rolę w rozwoju, przeżyciu i onkogenezie komórek. Początkowo uważano, że czynnik ten ulega aktywacji w czasie indukcji apoptozy pod wpływem TRAIL, sugerując że NF κ B jest zaangażowany w indukcję apoptozy pod wpływem TRAIL [15, 20, 37]. Niemniej jednak kolejne badania na innych modelach doświadczalnych pozwoliły ustalić, że NF- κ B owszem jest aktywowany, ale działa antagonistycznie do TRAIL [38]. Jego konstytutywna aktywacja w komórkach raka nerki (RCC) powodowała oporność zarówno na TRAIL, jak i apoptozę.

5. TOKSYCZNOŚĆ TRAIL

Początkowe wyniki badań pokazujące brak toksyczności TRAIL wobec nie-transformowanych komórek były przeprowadzone na dużej grupie komórek, ale oczywiście nie na wszystkich liniach komórkowych. Analizowano toksyczność TRAIL przy zastosowaniu układów *in vitro* i *in vivo* na myszach i naczelnych. Przeprowadzone później badania na ludzkich liniach komórkowych ujawniły nowe fakty. Okazało się, że TRAIL może działać toksycznie wobec ludzkich hepatocytów [9, 39, 40]. W doświadczeniach wykonanych przez Jo i wsp. [9] ponad 60% ludzkich hepatocytów było niszczone po 6 h inkubacji przy stężeniu TRAIL 200–400 ng/ml. Natomiast rekombinowany TRAIL (rhTRAIL) nie jest toksyczny dla hepatocytów innych gatunków, w tym myszy i szympansov. Wyników tych nie potwierdza Ashkenazi, twierdząc, że przyczyną śmierci hepatocytów jest używana przez Jo forma TRAIL mająca dodatkowe histydyny (TRAIL.His). Z doświadczeń Ashkenaziego wynika, że zastosowanie rekombinowanego TRAIL bez egzogennych histydyn (TRAIL.0) prowadzi jedynie do powstania lekko zaznaczonych zmian morfologicznych w hepatocytach, przy zachowanej pełnej aktywności przeciwnowotworowej. Doświadczenia te potwierdzają fakt, że hepatocyty hodowane *in vitro* zwiększają ekspresję receptora DR4 [9, 41]. Ponadto w doświadczeniach tych wykazano za pomocą cytometrii przepływowej, że TRAIL.0 wykazywał niewielki wpływ na hepatocyty nawet w stężeniach 100 mg/ml, natomiast TRAIL.His powodował śmierć hepatocytów już w stężeniach 0,1 μ g/ml [8, 41]. Pojawiły się również prace, w których udało się

TABELA 1. Niektóre kombinacje chemioterapeutyków potęgujące działanie przeciwnowotworowe TRAIL

Chemioterapeutyk łączony z TRAIL	Badana linia komórkowa	Mechanizm wzmocnienia efektu przeciwnowotworowego
Cisplatyna i paclitaksel	rak jajnika (SKOV-3, A2780 i IGROV-1)	zwiększona aktywacja kaspaz [52]
Dokсорubicyna, cis-platyna, etopozyd i gemcitabina	mesothelioma	zwiększone uwalnianie cytochromu c z mitochondriów [53]
Aktynomycyna D	przewłękła białaczka limfocytarna	zmniejszenie ekspresji białka blokującego FADD, FLIP
Pioglitazon	rakowiak	indukcja ekspresji p21 waf1/cip1

uzyskać protekcję hepatocytów przed TRAIL wykorzystując inhibitor kaspazy 9 Z-LEHD-FMK. Ozoren i wsp. wykazali, że jednocześnie istnieją linie nowotworowe, takie jak SW480 czy H460, które pomimo zastosowania inhibitora kaspazy 9 nadal pozostają wrażliwe na TRAIL [42]. Stwarza to szansę na bezpieczne zastosowanie TRAIL w terapii raka okrężnicy i raka płuc. TRAIL może indukować również apoptozę w ludzkich, nietransformowanych komórkach nabłonka prostaty [12]. Wysoka wrażliwość komórek nabłonka prostaty na działanie TRAIL jest spowodowana niską ekspresją receptorów kotwiczących TRAIL DcR1 i DcR2.

Niemniej jednak nawet przy pewnej toksyczności TRAIL nadal pozostaje interesującym lekiem do zastosowania w terapii nowotworów, zwłaszcza gdy uwzględnia się fakt, że obecnie stosowane chemioterapeutyki są dużo bardziej toksyczne.

6. CZY TRAIL STANIE SIĘ PANACEUM W TERAPII NOWOTWORÓW?

Specyficzne właściwości TRAIL, mianowicie jego selektywna toksyczność w stosunku do wielu linii komórek nowotworowych i oporność większości niestansformowanych komórek na apoptozę wywołaną TRAIL stawiają tę cytokinę w szeregu bardzo obiecujących kandydatów do terapii nowotworów. Przede wszystkim TRAIL eliminuje główną zmoż współczesnych terapii chemioterapeutykami, czyli ogólnoustrojową toksyczność. Ponadto jest jak na razie jedyną cząsteczką nadrodziny TNF, która podana ogólnoustrojowo jest nie tylko skuteczna, ale i bezpieczna. Nie dziwi więc lawina prac, jakie ukazują się co roku, w których TRAIL stosowany jest w najróżniejszych kombinacjach nie tylko z chemioterapeutykami, ale również z radioterapią, jak i w postaci terapii genowej, a publikowane wyniki są nie tylko obiecujące, ale świadczą o dużej skuteczności tych kombinacji.

Łączenie tradycyjnej chemioterapii nowotworów z TRAIL okazało się skuteczne w przypadku kombinacji wielu terapeutyków umożliwiając redukcję dawki i zmniejszając toksyczność ogólnoustrojową z zachowaniem tej samej aktywności przeciwnowotworowej. Komórki szpiczaka mające nieaktywną formę białka p53, transfekowane genem dla białka p53 stawały się bardziej wrażliwe na apoptozę indukowaną TRAIL. [43]. W przypadku przewlekłej białaczki limfocytarnej typu B, której komórki wykazywały konstytutywnie ekspresję receptorów dla TRAIL, łącząc TRAIL z aktynomycyną D uzyskiwano zwiększoną aktywność przeciwnowotworową w mechanizmie zmniejszenia ekspresji białka blokującego FADD, FLIP [44].

Pioglitazon, agonista receptora PPAR-gamma, zwiększał apoptozę wywołaną TRAIL indukując ekspresję p21/waf1/cip1 w komórkach rakowiaka [45]. Wykazano również na komórkach szpiczaka mnogiego, że TRAIL odwraca oporność tych komórek na terapię doksorubicyną, deksametazonem, mitoksantronem, mel-phalanem. Doksorubicyna zwiększała ekspresję DR5 uwrażliwiając nawet komórki, które wcześniej były odporne na działanie deksametazonu. Inhibitory aktywacji czynnika transkrypcyjnego, NF- κ B, SN50 inhibitor transkrypcyjnej aktywacji NF- κ B, PS-341, inhibitor proteasomu uwrażliwiały komórki na działanie chemioterapii. [46]. Cisplatyna, 5-fluorouracyl, paclitaksel, doksorubicyna, camptothecin potęgowały apoptozę wywołaną TRAIL w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc w mechanizmie niezależnym od ekspresji c-FLIP [47]. To tylko niektóre przykłady zastosowania TRAIL w kombinacji z chemioterapią.

Różna ekspresja receptorów dla TRAIL na powierzchni komórek może decydować o ich oporności bądź wrażliwości na apoptozę wywołaną TRAIL. Zależność taką wykazano wobec komórek raka trzustki, w których różna ekspresja receptora DR5, ale nie DR4 decydowała o ich wrażliwości lub oporności [48].

Takich przykładów można podawać wiele. Widać, że w różnych komórkach nowotworowych odmienne mechanizmy są odpowiedzialne za potęgowanie działania TRAIL. Sugeruje to, że nie ma najprawdopodobniej jednego uniwersalnego szlaku odpowiedzialnego za uwrażliwienie komórek na działanie TRAIL. Istnieje też coraz więcej doniesień o oporności komórek nowotworowych wobec TRAIL. Jednak nadal cytokina ta pozostaje bardzo obiecującym, ale niestety drogim lekiem w terapii nowotworów. Interakcja TRAIL na powierzchni limfocyta T jako ligandu z receptorem dla TRAIL na powierzchni komórki docelowej może odgrywać ważną rolę w eliminacji powstających komórek nowotworowych i być jednym z mechanizmów indukcji spontanicznej cytotoxyczności. Wykazano mianowicie *in vitro*, że ludzkie limfocyty T pomocnicze, specyficzne dla antygeny w czasie aktywacji są w stanie indukować apoptozę na powierzchni komórek glejaka dzięki interakcji TRAIL na powierzchni limfocytów T cytotoxycznych z receptorami dla TRAIL, TRAIL-R1 i TRAIL-R2 na powierzchni komórek glejaka. Efekt ten nie zależał od stopnia zróżnicowania limfocytów Th ani od specyficzności antygeny, którym pobudzano limfocyty Th [49].

Ciekawą wydaje się strategia wykorzystania retrowirusów jako donorów aktywnego TRAIL. Komórki zakażone wirusem mysiej białaczki Moloneya, mającym zre-kombinowany gen dla TRAIL, produkowały cząsteczki wirusa z białkiem TRAIL na

powierzchni kapsydu. Taki TRAIL był aktywny biologicznie, co sprawdzano na komórkach linii Jurkat. Zakażone takim wirusem komórki mają ekspresję TRAIL na swojej powierzchni i są również zdolne do indukcji apoptozy w komórkach docelowych. Blokowanie receptorów DR-5 na powierzchni komórek docelowych całkowicie znosiło efekt indukcji apoptozy przez cząsteczki wirusa, jak i przez komórki zakażone tym wirusem [50].

Prowadzi się też liczne badania przedkliniczne, w których są testowane dawki TRAIL i jego farmakokinetyka na myszach, szczurach i małpach naczelnych. W eksperymentalnej terapii myszy z wszczepionym gruczolakorakiem stosowano dawkę dobową TRAIL 30–120 mg/kg. W porównaniu z grupą nieleczoną obserwowano znaczne spowolnienie wzrostu guza u myszy leczonych TRAIL [51]. Do badań farmakokinetycznych ustalono dawkę TRAIL na 5–10 mg/kg masy ciała i podawano dożylnie w dawce jednorazowej. TRAIL w organizmie jest szybko eliminowany. Okres półtrwania TRAIL u gryzoni wynosił 3–5 minut, a u małp naczelnych ok. 30 minut [51]. Wyniki uzyskane na zwierzętach odniesiono do ludzi (stosując specjalny program komputerowy). Dane uzyskane na modelu zwierzęcym sugerują, że u ludzi dawka efektywna TRAIL wynosi 1 mg/kg masy ciała i jest znacznie niższa niż u zwierząt. Klirens TRAIL ściśle korelował z intensywnością filtracji kłębuszkowej sugerując, że cytokina ta jest głównie eliminowana przez nerki [51].

Zastanawiający jest fakt tak powszechnego występowania TRAIL w komórkach organizmów i brak specyficzności gatunkowej tej cytokiny, co sugeruje, że być może w procesie ewolucji dziedziczenie genu kodującego TRAIL i jego receptorów było korzystną cechą umożliwiającą przeżycie organizmu. Niezwykle ciekawe jest też zjawisko, iż komórki nowotworowe, które przecież tracą zdolność do produkcji wielu białek w procesie onkogenezy, zachowują zdolność ekspresji mRNA dla TRAIL i jego receptorów. Być może w najbliższym czasie będziemy świadkami odkrycia prawdziwej roli fizjologicznej TRAIL. Niewątpliwie jest to obecnie najbardziej obiecująca cytokina stosowana w terapii nowotworów. Czy i kiedy TRAIL stanie się powszechnie dostępnym lekiem przeciwnowotworowym, pozostaje nadal niewiadomym. Na pewno ustalenie fizjologicznej roli TRAIL i ostateczne zdeterminowanie przyczyn jego toksyczności przybliżą ten moment.

LITERATURA

- [1] SEOL D, BILLIAR T. Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activity. *Cancer Res* 2000; **60**: 3152–3154.
- [2] WILEY S, SCHOOLEY K, SMOLAK P, DIN W, HUANG C, NICHOLL J, SUTHERLAND G, SMITH T, RAUCH C, SMITH C. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; **3**: 673–682.
- [3] BODMER J, MEIER P, TSCHOPP J, SCHNEIDER P. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 2000; **275**: 20632–20637.
- [4] GRIFFITH TS, WILEY SR, KUBIN MZ, SEDGER LM, MALISZEWSKI CR, FANGER NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 1999; **189**: 1343–1353.

- [5] GRIFFITH TS, LYNCH D. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 559–563.
- [6] WALCZAK H, DEGLI-ESPOSTI MA, JOHNSON RS, SMOLAK PJ, WAUGH JY, BOIANI N, TIMOUR MS, GERHART MJ, SCHOOLEY KA, SMITH CA, GOODWIN RG, RAUCH CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997; **16**: 5386–5397.
- [7] WALCZAK H, MILLER RE, ARIAIL K, GLINIAK B, GRIFFITH TS, KUBIN M, CHIN W, JONES J, WOODWARD A, LE T, SMITH C, SMOLAK P, GOODWIN RG, RAUCH CT, SCHUH JC, LYNCH DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nature Med* 1999; **5**: 157–163.
- [8] ASHKENAZI A, PAI R, FONG S, LEUNG S, LAWRENCE D, MARSTERS S, BLACKIE C, CHANG L, MCMURTREY A, HEBERT A, DEFORGE L, KOUMENIS I, LEWIS D, HARRIS L, BUSSIÈRE J, KOEPPEN H, SHAHROKH Z, SCHWALL R. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; **104**: 155–162.
- [9] JO M, KIM TH, SEOL DW, ESPLEN JE, DORKO K, BILLIAR TR, STROM S. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; **6**: 564–567.
- [10] MITSIADES N, POULAKI V, MITSIADES CS, KOUTRAS DA, CHROUSOS G. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2001; **12**: 384–390.
- [11] SIMON AK, WILLIAMS O, MONGKOLSAPAYA J, JIN B, XU XN, WALCZAK H, SCREATOR G. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes. *PNAS* 2001; **98**: 5158–5163.
- [12] NESEROV A, IVASHCHENKO Y, KRAFT A. Tumor-necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* 2002; **21**: 1135–1140.
- [13] SUN-SHIN C, BYUNG-JE S, YOUNG-A K, YOUNG-LAN S, HYUN-JU K, SUNSHIN K, MYUNG-SHIK L, BYUNG-HA O. Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 31171–31177.
- [14] PITTI RM. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor receptor family. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12687–12690.
- [15] PAN G, O'ROURKE K, CHINNAIYAN AM, GENTZ R, EBNER R, NI J, DIXIT V. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997; **276**: 111–113.
- [16] WALCZAK H, KRAMMER P. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000; **256**: 58–66.
- [17] DAIGLE I, SIMON H. Alternative functions for TRAIL receptors in eosinophils and neutrophils. *Swiss Med Wkly* 2001; **131**: 231–237.
- [18] BRETZ JD, MEZOSI E, GIORDANO TJ, GAUGER PG, THOMPSON NW, BAKER JR J. Inflammatory cytokine regulation of TRAIL-mediated apoptosis in thyroid epithelial cells. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 274–286.
- [19] SIMON A, WILLIAMS O, MONGKOLSAPAYA J, JIN B, XU XN, WALCZAK H, SCREATOR G. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes. *PNAS* 2001; **98**: 5158–5163.
- [20] PAN G, NI J, WEI YF, YU G, GENTZ R, DIXIT V. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997; **277**: 815–818.
- [21] SCHNEIDER P, THOME M, BURNS K, BODMER JL, HOFMANN K, KATAOKA T, HOLLER N, TSCHOPP J. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* 1997; **7**: 831–836.
- [22] WALCZAK H, DEGLI-ESPOSTI MA, JOHNSON RS, SMOLAK PJ, WAUGH JY, BOIANI N, TIMOUR MS, GERHART MJ, SCHOOLEY KA, SMITH CA, GOODWIN RG, RAUCH C. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997; **16**: 5386–5397.
- [23] SHERIDAN JP, MARSTERS SA, PITTI RM, GURNEY A, SKUBATCH M, BALDWIN D, RAMAKRISHNAN L, GRAY CL, BAKER K, WOOD WI, GODDARD AD, GODOWSKI P, ASHKENAZI A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997; **277**: 818–821.

- [24] DEGLI-ESPOSTI MA, SMOLAK PJ, WALCZAK H, WAUGH J, HUANG CP, DUBOSE RF, GOODWIN RG, CA. S. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 1997; **186**: 1165–1170.
- [25] EMERY JG, MCDONNELL P, BURKE MB, DEEN KC, LYN S, SILVERMAN C, DUL E, APPELBAUM ER, EICHMAN C, DIPRINZIO R, DODDS RA, JAMES IE, ROSENBERG M, LEE JC, YOUNG P. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; **273**: 14363–14367.
- [26] DEGLI-ESPOSTI M. To die or not to die – the quest of the TRAIL receptors. *JLeukocBiol* 1999; **65**: 535–542.
- [27] KUANG AA, DIEHL GE, ZHANG J, WINOTO A. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25065–25068.
- [28] KISCHKE FC, LAWRENCE DA, CHUNTHARAPAI A, SCHOW P, KIM KJ, ASHKENAZI A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000; **12**: 611–620.
- [29] SULIMAN A, LAM A, DATTA R, SRIVASTAVA R. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 2001; **20**: 2122–2133.
- [30] YEH WC, POMPA JL, MCCURRACH ME, SHU HB, ELIA AJ, SHAHINIAN A, NG M, WAKEHAM A, KHOO W, MITCHELL K, EL-DEIRY WS, LOWE SW, GOEDEL DV, MAK T. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 1998; **279**: 1954–1958.
- [31] FULDA S, KUFER MU, MEYER E, VAN VALEN F, DOCKHORN-DWORNICZAK B, DEBATIN K. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001; **20**: 5865–5877.
- [32] SALVESEN G. Caspase 8: igniting the death machine. *Structure Fold Des* 1999; **7**: R225–229.
- [33] SALVESEN GS, DIXIT V. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10964–10967.
- [34] GREEN D, REED J. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312.
- [35] LI YQ, WONG C. Apoptosis and its relationship with cell proliferation in the irradiated rat spinal cord. *Int J Radiat Biol* 1998; **74**: 405–417.
- [36] DATTA S. *GenesDev* 1999; **13**: 2905–2927.
- [37] CHAUDHARY P, EBY M, JASMIN A, BOOKWALTER A, MURRAY J, HOOD L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. *Immunity* 1997; **7**: 821–830.
- [38] OYA M, OHTSUBO M, TAKAYANAGI A, TACHIBANA M, SHIMIZU N, MURAI M. Constitutive activation of nuclear factor- κ B prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 2001; **20**: 3888–3896.
- [39] NAGATA S. Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nat Med* 2000; **6**: 502–503.
- [40] LAWRENCE D, SHAHROKH Z, MARSTERS S, ACHILLES K, SHIH D, MOUNHO B, HILLAN K, TOTPAL K, DEFORGE L, SCHOW P, HOOLEY J, SHERWOOD S, PAI R, LEUNG S, KHAN L, GLINIAK B, BUSSIÈRE J, SMITH CA, STROM SS, KELLEY S, FOX JA, THOMAS D, ASHKENAZI A. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 2001; **7**: 383–385.
- [41] DE VRIES EG, VAN DER GRAAF WT, HEIJENBROEK FJ, HOEKSTRA HJ, DE JONG S. Don't blaze the trailblazer TRAIL too early. *Lancet* 2000; **356**: 2014.
- [42] OZOREN N, KIM K, BURNS TF, DICKER DT, MOSCIONI AD, EL-DEIRY W. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000; **60**: 6259–6265.
- [43] LIU Q, EL-DEIRY WS, GAZITT Y. Additive effect of Apo2L/TRAIL and Adeno-p53 in the induction of apoptosis in myeloma cell lines. *Exp Hematol* 2001; **29**: 962–970.
- [44] OLSSON A, DIAZ T, AGUILAR-SANTELISES M, OSTERBORG A, CELSING F, JONDAL M, OSORIO L. Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D. *Leukemia* 2001; **15**: 1868–1877.
- [45] GOKE R, GOKE A, GOKE B, EL-DEIRY WS, CHEN Y. Pioglitazone inhibits growth of carcinoid cells and promotes TRAIL-induced apoptosis by induction of p21waf1/cip1. *Digestion* 2001; **64**: 75–80.
- [46] MITSIADES CS, TREON SP, MITSIADES N, SHIMA Y, RICHARDSON P, SCHLOSSMAN R, HIDE-SHIMA T, ANDERSON K. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001; **98**: 795–804.

- [47] FRESE S, BRUNNER T, GUGGER M, UDUEHI A, SCHMID R. Enhancement of Apo2L/TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines by chemotherapeutic agents without correlation to the expression level of cellular protease caspase-8 inhibitory protein. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **123**: 168–174.
- [48] LIAO Q, FRIESS H, KLEEFF J, BUCHLER M. Differential expression of TRAIL-R3 and TRAIL-R4 in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2001; **21**: 3153–3159.
- [49] DORR J, WAICZIES S, WENDLING U, SEEGER B, ZIPP F. Induction of TRAIL-mediated glioma cell death by human T cells. *J Neuroimmunol* 2002; **122**: 117–124.
- [50] STREHLOW D, JODO S, JU S. Retroviral membrane display of apoptotic effector molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4209–4214.
- [51] KELLEY SK, HARRIS LA, XIE D, DEFORGE L, TOTPAL K, BUSSIÈRE J, FOX J. Pre-clinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of *in vivo* efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299**: 31–38.
- [52] VIGNATI S, CODEGONI A, POLATO F, BROGGINI M. Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs. *Eur J Cancer* 2002; **38**: 177–183.
- [53] LIU W, BODLE E, CHEN JY, GAO M, ROSEN GD, BROADDUS V. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; **25**: 111–118.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 02.07. 2002 r.

Przyjęto: 30.08. 2002 r.

02-004 Warszawa, ul. Chalubińskiego 5

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

KASPAZY KRĘGOWCÓW; ICH ROLA W PRZEBIEGU APOPTOZY*

CASPASES OF THE VERTEBRATES — THEIR ROLE IN APOPTOSIS

Zofia M. KILIAŃSKA, Agnieszka MIŚKIEWICZ

Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Apoptoza albo śmierć programowana stanowi fizjologiczny proces odpowiedzialny za prawidłowy rozwój i utrzymanie homeostazy wielokomórkowych organizmów. Proces ten przebiega dzięki sprawnie funkcjonującej maszynerii śmierci, której głównym składnikiem są proteazy cysteino-we — z rodziny kaspaz. Enzymy te występują w komórkach w formie nieczynnej i ulegają aktywacji podczas apoptozy indukowanej różnymi czynnikami. Niniejszy przegląd stanowi podsumowanie osiągnięć badań nad strukturą, mechanizmem aktywacji, właściwościami katalitycznymi, głównymi substratami kaspaz oraz regulacją ich aktywności. Ponadto przedstawiono w nim udział kaspaz w przebiegu głównych szlaków apoptozy.

Słowa kluczowe: apoptoza, kaspazy, regulacja aktywności kaspaz, substraty.

Summary: Apoptosis or programmed cell death is a physiological process responsible for normal development and maintenance of homeostasis in multicellular organisms. This process involves well working suicide machinery which core component is a family of cysteinyl-dependent aspartate proteases known as caspases. These enzymes lie in a latent form in cells and become activated in response to a wide variety of cell death stimuli. This review summaries main progress made on structure, mechanism of enzyme activation, catalytic properties, substrates of caspases and regulation of their activity. The article presents also an involvement of caspases in major apoptosis pathways.

Key words: apoptosis, caspases, regulation of caspase activity, substrates.

1. WSTĘP

Problemem umierania komórek interesowano się od dziesięcioleci, jednak dopiero w 1972 r. badacze John F. Kerr, Andrew H. Wyllie i Alastair R. Currie zaproponowali dla jednej z form śmierci komórkowej termin apoptoza (gr. *apoptosis*) oznaczający opadanie liści, płatków kwiatowych [39], podkreślając jej fizjologiczną naturę. Apoptoza,

*Niniejsza praca została wykonana w ramach działalności statutowej Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego.

inaczej śmierć programowana, samobójcza czy altruistyczna jest uznawana za aktywny proces współodpowiedzialny za precyzyjną kontrolę liczby i rodzaju komórek na równi z proliferacją, różnicowaniem i dojrzewaniem [22]. W wyniku apoptozy organizm pozbywa się nadmiaru niepotrzebnych komórek podczas różnicowania tkanek i narządów, a także eliminuje te z nich, które są zainfekowane, uszkodzone lub zmutowane [27, 55, 67]. Wiele stanów patologicznych, a przede wszystkim choroby neurodegeneracyjne wynikają ze zbyt intensywnej apoptozy. Z kolei upośledzenie tego procesu wiąże się z rozwojem licznych nowotworów oraz nabywaniem przez komórki nowotworowe oporności na chemioterapię [11, 22, 40, 57].

Dotychczas poznano wiele czynników zdolnych do wywołania śmierci komórek, związanych z uruchomieniem pierwszej fazy procesu apoptozy, czyli inicjacji lub wzbudzenia [22, 36, 55]. Są to przede wszystkim czynniki uszkodzające DNA i zaburzające cykl komórkowy, brak czynników wzrostowych, aktywacja określonych receptorów błonowych np. przez ligandy z rodziny TNF, szok termiczny, szok oksydacyjny, promieniowanie jonizujące, leki [2, 27, 30, 55]. Dalsze fazy apoptozy, tj. wykonawcza i zniszczenia, polegają na uruchomieniu w komórkach kaskady procesów proteolitycznych i nukleolitycznych. Ich efektem są typowe dla umierającej komórki zmiany morfologiczne: obkurczanie, zagęszczenie cytoplazmy, pojawienie się niewielkich pęcherzyków otaczających fragmenty cytoplazmy oraz powstawanie ciał apoptotycznych [36, 81]. Podczas kolejnych etapów apoptozy dochodzi do zmiany potencjału błon mitochondriów, translokacji fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej, aktywacji kinaz białkowych oraz aktywacji kaskady kaspaz [11, 32, 36, 52, 81]. Większość organelli komórkowych zachowuje swoją strukturę [39, 67], natomiast w jądrze komórek apoptotycznych obserwuje się kondensację chromatyny, która pozostając w kontakcie z błoną jądrową, ostatecznie tworzy kulistą, gęstą masę. Na poziomie molekularnym zmianom w jądrach komórek towarzyszy postępująca fragmentacja DNA [5, 36, 49, 57, 64, 81, 94].

Aktualnie uważa się, że aktywność proteaz, w tym kaspaz, wiąże się z aktywowaniem topoizomeraz (I i II), a także endonukleaz [64]. Rozszczepienie proteolityczne cząsteczek topoizomeraz, odpowiedzialnych za stabilizację struktury DNA, prowadzi do jego degradacji do odcinków o długości około 300 kpz. Postępująca degradacja DNA w komórkach ulegających apoptozie jest związana z powstawaniem fragmentów zawierających 20–50 kpz, które mogą (ale nie muszą) ulec dalszemu nukleolitycznemu cięciu do odcinków 180–200 pz lub ich wielokrotności. Cięcie między nukleosomami katalizuje endonukleaza DFF40/CAD (ang. *DNA fragmentation factor 40/caspase-activated deoxyribonuclease*), która w komórkach nie ulegających apoptozie występuje jako nieaktywny heterodimer w kompleksie z inhibitorem – DFF45/ICAD (ang. *DFF45/inhibitor of CAD*) [19, 35, 49]. W komórkach apoptotycznych kaspaza-3 (w mniejszym stopniu kaspaza-7) uwalnia przez proteolityczne cięcie inhibitor, umożliwiając formowanie aktywnych homooligomerów DFF40/CAD. Produkty działania aktywnej formy DFF40/CAD można uwidocznnić w żelu agarozowym w formie „drabinki”, uznawanej za marker molekularny apoptozy wielu komórek [94].

W piśmiennictwie polskim ukazały się liczne opracowania przeglądowe dotyczące różnych aspektów apoptozy [2, 24, 27–29, 37, 40a, 55, 68, 76, 81, 94, 95]. Niniejszy artykuł jest poświęcony kaspazom — głównym enzymom „maszinerii proteolitycznej” komórek apoptotycznych, dokonujących selektywnej i uporządkowanej degradacji białek strukturalnych i enzymatycznych, prowadzącej do unieczynnienia podstawowych procesów metabolicznych [11, 22, 40].

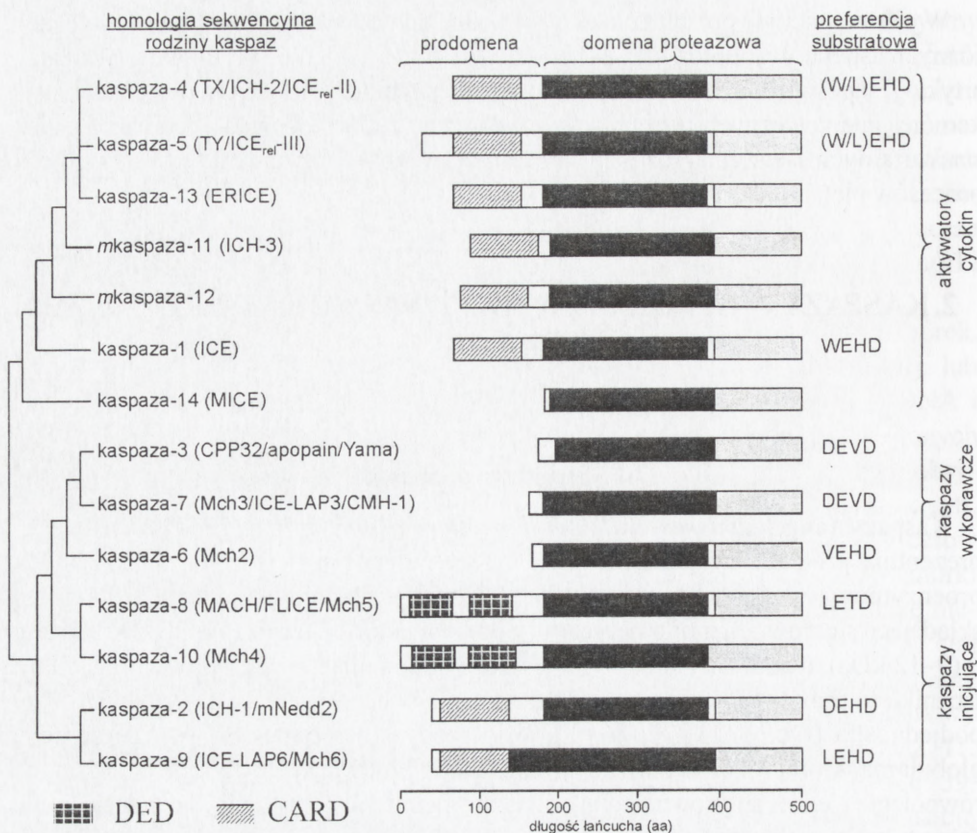
2. KASPAZY — STRUKTURA, AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNA; SUBSTRATY

2.1. Struktura prokaspaz

Kaspazy (ang. *caspases-cysteinyI-dependent aspartate specific proteases*) reprezentują proteazy cysteinowe, które syntetyzowane są w formie nieaktywnych proenzymów (zymogenów) [11, 40, 79]. Ich cząsteczkę buduje domena proteazowa składająca się z dwóch monomerycznych podjednostek: dużej α (17–20 kDa) i małej β (9–12 kDa), o znacznej homologii sekwencyjnej, połączonych zwykle niewielkim łącznikiem oraz tzw. prodomena znajdująca się w bezpośrednim sąsiedztwie dużej podjednostki (ryc.1) [11, 22, 26, 27, 40]. Każdy heterodimer $\alpha\beta$ tworzy domenę globularną, której rdzeń stanowi 6 struktur β „pofalowanej kartki” (pięć ułożonych równolegle i jednej antyrównoległej), otoczonych przez dwie α -helisy po jednej stronie i trzy α -helisy po stronie przeciwnej, usytuowanych prawie równolegle do struktur β . Na *N*-końcu zymogenu kaspaz znajdują się prodomeny o różnej długości (6–200 aminokwasów), tj. krótkie zwykle zbudowane z około 30 aminokwasów *N*-peptydy — spotykane wśród kaspaz wykonawczych lub długie — zawierające powyżej 100 aminokwasów, występujące wśród kaspaz inicjujących i związanych ze stanami zapalnymi [11, 26]. W dłuższych prodomenach występują motywy sekwencyjne, opisywane jako DED (ang. *death effector domain*) lub CARD (ang. *caspase recruitment domain*), odpowiednio hydrofobowe lub hydrofilowe [11, 79]. Te motywy biorą udział w oddziaływaniach między cząsteczkami prokaspaz i białkami adaptorowymi apoptozy, a także uczestniczą w aktywacji prokaspaz.

2.2. Mechanizm aktywacji i struktura aktywnych kaspaz

Aktywacja prokaspaz przebiega według dwóch różnych mechanizmów: homoaktywacji i heteroaktywacji [79]. Pierwszy z nich dotyczy aktywacji kaspaz inicjujących np. -8/-10, -9 przez autoproteolizę i wiąże się z powstawaniem istotnych dla przebiegu szlaku receptorowego i mitochondrialnego apoptozy kompleksów, tj. DISC (ang. *death-inducing signaling complex*) i apoptosomu (por. 3.1 i 3.2). Podczas formowania tych kompleksów dochodzi do oligomeryzacji cząsteczek kaspaz. Utworzone kompleksy na tych szlakach ulegają molekularnym „przeorganizowaniom”, w wyniku których



RYCINA 1. Schematyczne przedstawienie struktury prokaspaz ssaków oraz nazewnictwa i preferowanych przez kaspazy sekwencji w atakowanych substratach (wg [11], zmodyfikowana). Na rycinie uwzględniono położenie domeny proteazowej (podjednostkę większą i mniejszą przedstawiono odpowiednio w kolorze czarnym i szarym, zaznaczając obecność lub brak między nimi łącznika) i prodomeny wśród poszczególnych prokaspaz. W prodomenach zaznaczono występowanie specyficznych domen: DED i CARD, bądź sekwencji *N*-peptydu. Pokrewieństwo filogenetyczne rodziny kaspaz oparto na podobieństwie sekwencji domeny proteazowej. Po lewej stronie rysunku przedstawiono aktualnie używane nazwy kaspaz, a w nawiasach, ich alternatywne nazwy / symbole stosowane wcześniej

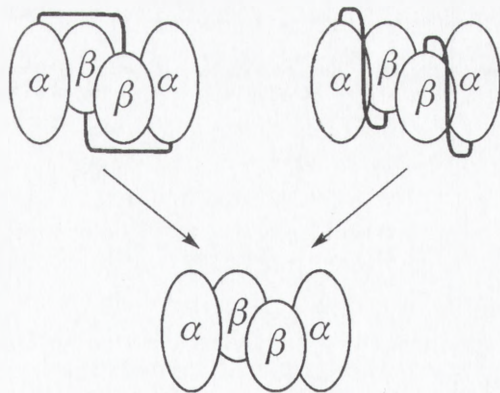
autoproteoliza prokaspaz inicjujących prowadzi do utworzenia ich aktywnych heterotetramerów. Pełna aktywacja kaspaz przez oligomeryzację wzmacnia ich aktywność, która przejawia się proteolizą kolejnych kaspaz (bądź kaskady kaspaz) [51]. Natomiast heteroaktywacja prowadzi do katalitycznego ataku kaspaz inicjujących (np. -8/-10, -9), bądź innych proteaz (np. granzym B, kalpaina) na kaspazy wykonawcze, przeprowadzając je w aktywne heterotetramery. Aktywna kaspaza jest więc heterotetramerem zbudowanym z dwóch małych i dwóch dużych podjednostek ($\alpha\beta$)₂, które mogą oddziaływać ze sobą w dwojaki sposób: podjednostka α łączy się z β w obrębie tego samego lub różnych heterodimerów (ryc. 2) [11, 79]. W momencie aktywacji najpierw usuwany jest niewielki odcinek łączący obie podjednostki, któremu przypisuje się funkcję ochronną przed samoaktywacją kaspaz, a następnie prodomena,

co prowadzi do dalszego przeorganizowania w aktywną postać enzymu. Na przykład w fazie wykonawczej apoptozy prokaspaza-3 (m.c. 32 kDa) jest rozszczepiona przez kaspazę-8 czy -9 do fragmentów o m. cz. 20/17 kDa i 12 kDa [60], które tworzą następnie aktywne heterotetramery [11, 87].

2.3. Podział kaspaz

Kaspazy wykazują wysoką specyficzność substratową; w tzw. miejscu P1 atakowanego substratu wymagają obecności kwasu asparaginowego (Asp). Opierając się na podobieństwach sekwencji oraz specyficzności substratowej poznanych dotąd kaspaz, w liczbie 14, podzielono je na trzy grupy (ryc. 1) [11, 26]:

- 1) **Aktywatory cytokin związane ze stanami zapalnymi:** kaspazy-1, -4, -5, -11, -12, -13 i -14 — rozpoznające w substracie motyw aminokwasów (W/L)EHD [11, 22, 86]. Wśród enzymów tej podrodziny najwcześniej zidentyfikowano kaspazę-1/ICE (ang. *interleukin-1 β -converting enzyme*) [cyt. wg 86]. Enzym ICE-1 β dokonuje bezpośredniego przekształcenia prekursora interleukiny-1 β w formę dojrzałą (mediatora stanów zapalnych), podczas gdy kaspaza-5 i -11 – pośrednio przez aktywację kaspazy-1. Wciąż budzi wątpliwość przynależność do tej grupy kaspaz: -4, -12, -13 i -14. Zaliczenie ich do grupy aktywatorów cytokin opiera się na podobieństwach sekwencji aminokwasowej z kaspazą-1 i choć ostatnie badania wskazują, że np. kaspaza-13 jest aktywowana przez kaspazę-8, to mechanizm jej działania jako aktywnej proteazy nie został dotąd wyjaśniony [79]. Podobne wątpliwości wzbudza zaszeregowanie kaspazy-14. Jej specyficzność substratowa pozwala na włączenie jej do grupy kaspaz stanów zapalnych, lecz ze względu na obecność krótkiej prodomeny enzym ten może pełnić funkcje kaspazy wykonawczej [90].
- 2) **Efektory fazy wykonawczej:** kaspazy-3, -6 i -7 — rozpoznające sekwencję docelową substratu DEXD (X może oznaczać: V, T, H) [22, 86]. Enzymy tej grupy ulegają aktywacji przez inne proteazy, np. kaspazy inicjujące lub inne kaspazy wykonawcze [36, 90], a także granzym B [61]. Wyniki doświadczeń *in vitro* wykazały, że prokaspazy-3 i -7 mogą być aktywowane przez kaspazy-6, -8, -9 i -10. W przypadku rozszczepienia np. prokaspazy-8 (m.c. 55 kDa) powstaje aktywny heterodimer złożony z podjednostek p20 i p12 [45], które tworzą następnie heterotetramer i w tej postaci mogą „włączać” kaskadę kaspaz wykonawczych [5].

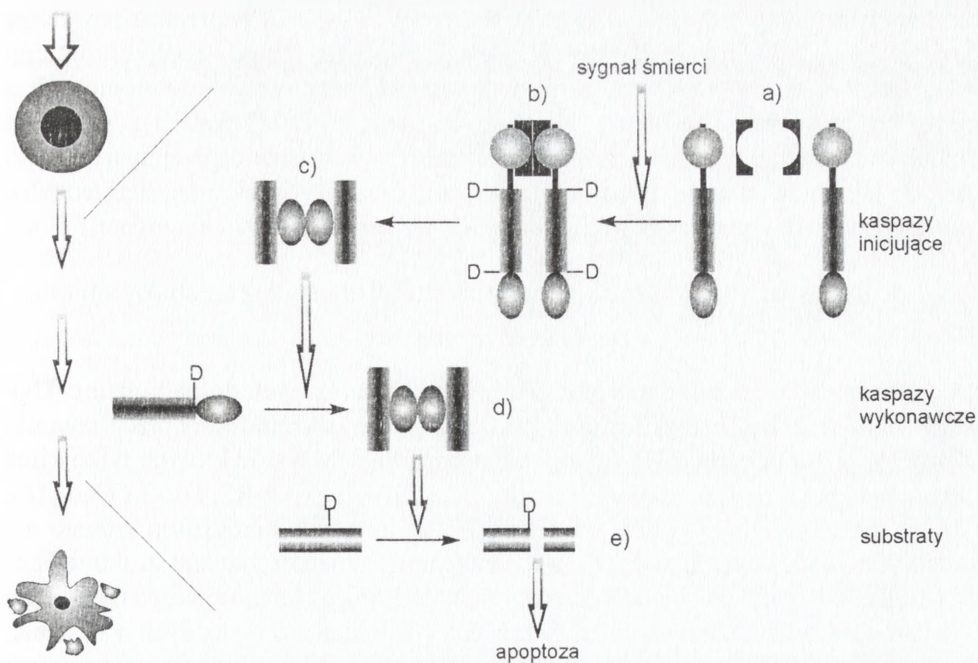


RYCINA 2. Schemat powstawania aktywnego heterotetrameru kaspazy (na podstawie [79]). Tworzenie tetrameru może przebiegać przez łączenie podjednostki większej (α) i mniejszej (β) z dwóch różnych cząsteczek zymogenu lub przez prostą oligomeryzację cząsteczek zymogenu (αβ)₂.

3) **Inicjatory fazy wykonawczej:** kaspazy-2, -8, -9, -10 i -12 – rozpoznające w substratach sekwencję tetrapeptydu (I, V, L) EXD (X oznacza dowolny aminokwas) [11, 23, 86]. Pewne wątpliwości wzbudza zaszeregowanie do tej grupy kaspazy-2 [80]. Niektórzy badacze sugerują, że ze względu na obecność domeny CARD w zymogenie kaspazy-2, (przez którą łączy się z białkami adaptorowymi i indukuje apoptozę) można traktować ten enzym jako kaspazę inicjującą [22]. Jednak z uwagi na zdolność kaspazy-2 do bezpośredniej proteolizy niektórych substratów np. polimerazy poli(ADP-rybozy) – PARP, zaliczana jest do enzymów wykonawczych apoptozy [36, 40]. Podobne wątpliwości wzbudza sposób zaszeregowania kaspazy-12. Chociaż kaspaza-12 może sama aktywować inne kaspazy lub być przez nie aktywowana, to część badaczy zalicza ten enzym do grupy kaspaz indukujących stany zapalne [11, 40], z uwagi na jej znaczną homologię w budowie z kaspazą: -1, -4, -5 i -11 wykazującą odpowiednio 39, 48, 45 i 38% identyczności sekwencji aminokwasowej [59].

2.4. Katalityczna aktywność kaspaz; substraty

W aktywnych kaspazach (forma heterotetrameru) zidentyfikowano dwa centra aktywne usytuowane w szczelinach, tworzonych przez podjednostki α i β , praw-dopodobnie sprawujące funkcje katalityczne niezależnie [26]. W centrum aktywnym Cys²⁸⁵ zbliża się do imidazolowego pierścienia His²³⁷ (np. w podjednostce α kaspazy-1), przyciągając proton cysteiny, co nasila właściwości nukleofilowe tego aminokwasu. Łańcuchy boczne z Arg¹⁷⁹ (podjednostka α) i Arg³⁴¹ (podjednostka β) tworzą miejsce S1 enzymu uczestniczące w bezpośredniej interakcji z kwasem asparaginowym substratu w miejscu P1, który jest ostatnim aminokwasem motywu (P4←P1), rozpoznawanym przez kaspazę. Obecność Asp w miejscu P1 jest bardzo ważna dla aktywności enzymu, a podstawienie tej reszty innym aminokwasem przyczynia się do znacznego obniżenia efektywności proteolitycznej kaspaz [11]. Aminokwasy podjednostki β tworzą miejsca S2 i S3, które oddziałują z miejscem P2 i P3 substratu. Główne różnice między kaspazami dotyczą miejsca S4. Analizy porównawcze wykazały, że to miejsce w kaspazie-1 stanowi płytkie, hydrofobowe zagłębienie, zaś w kaspazie-3 wąską kieszeń dopasowującą się do łańcuchów bocznych miejsca P4 substratu, odpowiednio Tyr i Asp [11]. Najważniejsze funkcje w ataku proteolitycznym kaspaz odgrywa centralnie położona cysteina centrum aktywnego QACXG, a odcinek ten stanowi najbardziej zakonserwowany motyw tych proteaz. Podjednostki mniejsza i większa pochodzące z dwóch cząsteczek prokaspazy uwalniają się po cięciu krytycznych reszt kwasu asparaginowego formując aktywny heterotetramer (ryc. 3) [11, 40, 87]. Liczne badania nad mechanizmami proteolizy przez kaspazy wskazują, że enzymy te funkcjonują zwykle w kaskadzie: kaspaza początkowa – inicjująca, aktywuje jedną lub kilka kaspaz wykonawczych, które następnie dokonują cięcia odpowiednich substratów prowadząc do śmierci komórki. Dotychczas zidentyfikowano ponad 60 białek będących substratami kaspaz (por. tab. 1). Pierwszym opisanym substratem dla tej rodziny proteaz cysteinowych (dla kaspazy-3) była polimeraza poli(ADP-rybozy) [46]. Wśród białek



RYCINA 3. Udział kaskady kaspaz w apoptozie komórek (na podstawie [11], zmodyfikowana). W przekazywaniu sygnału apoptotycznego w komórkach na szlaku receptorowym czy mitochondrialnym dochodzi do oligomeryzacji (a) białek adaptorowych (np. FADD czy Apaf-1). Oligomery tych białek inicjują oligomeryzację prokaspaz inicjujących (b) i ich autoproteolityczną aktywację (usunięcie prodomeny, ewentualnie łącznika oraz uwolnienie podjednostek po proteolitycznym cięciu po reszcie Asp (D); c). Aktywne kaspazy inicjujące dokonują proteolizy i aktywacji kaspaz wykonawczych (d). Z kolei kaspazy wykonawcze rozszczepiają różne białka komórkowe (e), w tym również inne prokaspazy (uruchamiając „pętlę kaspaz”), co prowadzi do rozpadu struktur komórkowych, wyłączenia procesów metabolicznych i śmierci komórek

ulegających proteolizie przez kaspazy wymienia się m.in. białka cyto- i nukleoszkieletu, enzymy zaangażowane w sygnalizację komórkową, białka związane z metabolizmem i naprawą DNA, metabolizmem RNA, regulatory cyklu komórkowego, czynniki transkrypcyjne, tzw. białka śmierci, polipeptydy, których zaburzona ekspresja jest związana z niektórymi chorobami [11, 23, 26, 40, 87, 90].

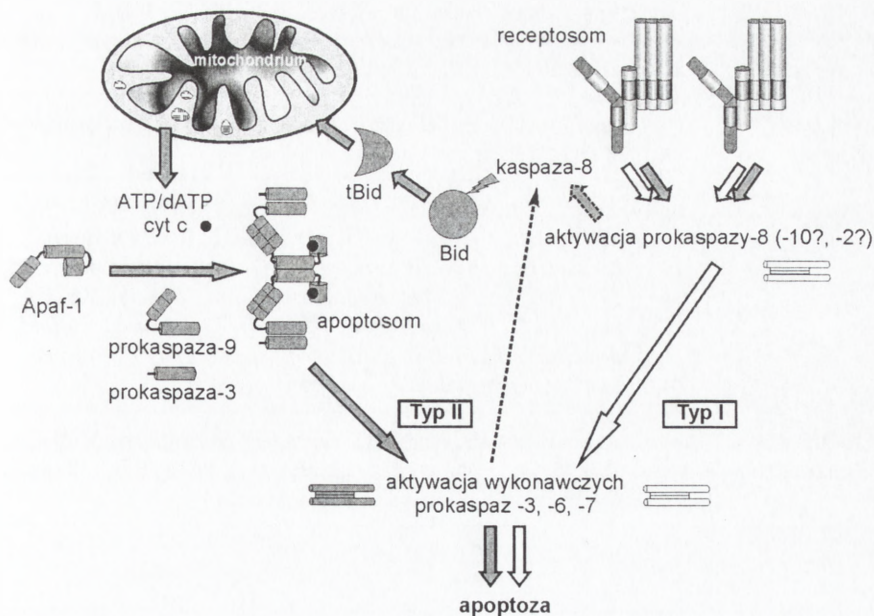
3. UDZIAŁ KASPAZ W APOPTOZIE

W bogatej literaturze dotyczącej sygnalizacji apoptotycznej w komórkach różnych typów obserwuje się próby „uporządkowania” opisanych dotąd szlaków, inicjowanych licznymi czynnikami [14, 32, 75]. Podstawą wyróżnienia dwóch głównych szlaków apoptozy, tj. zewnętrznego – receptorowego i wewnętrznego – mitochondrialnego jest sposób aktywacji inicjujących je prokaspaz (ryc. 4) [14]. W pierwszym z nich –

zewnętrznym aktywację inicjujących prokaspaz (-2, -8, -10) poprzedza powstanie „receptosomu”, utworzonego w wyniku pobudzenia przez ligand – receptora śmierci (ang. *death receptor* – DR) i związania białka (białek) adaptorowego. Autoproteoliza prokaspaz prowadzi do powstania aktywnego kompleksu – DISC (por. 3.1.). Natomiast na szlaku zewnętrznym, istotną funkcję w transmisji sygnału śmierci przejmują czynniki mitochondrialne uwalniane do cytosolu, zaangażowane w aktywację inicjującej ten szlak prokaspazy-9 i utworzenie aktywnego kompleksu zwanego apoptosomem (por. 3.2.).

3.1. Rola kaspaz w przebiegu apoptozy stymulowanej przez receptory śmierci (tzw. szlak zewnętrzny)

Aktywacja określonych receptorów błonowych należących do nadrodziny TNF (ang. *tumor necrosis factor*) inicjuje szlak apoptotyczny stymulowany przez czynniki zewnętrzne. Nadrodzinę TNF tworzy kilkanaście białek, wśród których tylko kilka bierze udział w procesie apoptozy. Są to: Fas, TNF-R1, TNF-R2, DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2) i DR-6 – receptor sierocy, dla którego nie zidentyfikowano dotąd ligandu [27, 93]. Dotychczas najlepiej poznano strukturę Fas i TNF-R1. Receptory te są białkami transbłonowymi, które cechuje znaczna homologia w obszarze zewnątrzbłonowym, który zawiera 3–6 domen wzbogaconych w cysteinę, istotnych w rozpoznawaniu odpowiednich ligandów [5]. W cytoplazmatycznych regionach tych receptorów dominuje przede wszystkim homologia funkcjonalna ze względu na obecność specyficznej sekwencji liczącej 80–90 aminokwasów, tworzącej tzw. domenę śmierci DD (ang. *death domain*). Domena ta uczestniczy w wiązaniu receptorów z białkami adaptorowymi, które również wyposażone są w domeny śmierci np. FADD (ang. *Fas-associated death domain*), TRADD (ang. *TNF-R1 receptor associated death domain*), RIP (ang. *receptor interacting protein*) [22, 27, 72]. Ligandami receptorów Fas i TNF-R1 są odpowiednio cytokiny Fas-L i TNF, które mogą wiązać się z receptorami tych samych lub sąsiednich komórek tworząc bezpośrednie połączenia. Po związaniu Fas-L przez Fas dochodzi do trimeryzacji receptora i utworzenia agregatów, które wnikają do cytoplazmy [14, 22, 27, 57]. Sygnał śmierci jest dalej przekazywany za pośrednictwem białka adaptorowego FADD. Białko to w C-końcu łańcucha zawiera domenę DD, natomiast na N-końcu domenę DED, przez którą łączy się z analogiczną domeną prokaspazy-8 lub -10, tworząc kompleks DISC [14, 22]. W przypadku, gdy TNF-R1 zwiąże ligand TNF, tworzy się kompleks z białkiem TRADD, które sygnał śmierci może przekazywać na białko FADD i prokaspazę-8. Ponadto białko TRADD może łączyć się z kinazą serynowo-treoninową RIP, a ta z kolei z innym adaptorem — RAIDD/CRADD (ang. *RIP-associated ICH1/CED3 homologous protein with DD*) i aktywować prokaspazę-2 [22, 27]. Na szlaku apoptotycznym inicjowanym przez związanie ligandu TNF przez TNF-R1 również powstaje kompleks DISC [14, 57]. W wyniku molekularnego „przeorganizowania” kompleksu DISC dochodzi do autoproteolizy prokaspaz inicjujących (-2, -8, -9, -10) i utworzenia ich formy aktywnej (heterotetramery), dzięki której dokonują następnie aktywacji prokaspaz wykonawczych. Te ostatnie enzymy indywidualnie lub wraz z innymi



RYCINA 4. Schematyczne przedstawienie szlaku receptorowego i mitochondrialnego apoptozy oraz możliwości ich połączenia przez skróconą formę białka Bid (tBid) w dwóch typach komórek apoptotycznych (na podstawie [14]). W komórkach apoptotycznych typu I (strzałki niewypełnione) na szlaku indukowanym reakcją ligand–receptor i po związaniu oligomerów białka adaptorowego formuje się receptosom, z którym wiążą się cząsteczki prokaspazy inicjującej -8 (-10, -2?), tworząc aktywny kompleks DISC. W tym kompleksie dochodzi do natychmiastowej autoproteolizy i powstania licznych aktywnych cząsteczek kaspazy inicjującej, które prowadzą bezpośrednio i wydają aktywację kaspaz wykonawczych. Natomiast w komórkach typu II (strzałki wypełnione) powstawanie aktywnego kompleksu DISC przebiega z niewielką szybkością, czego konsekwencją jest zmniejszona aktywacja prokaspazy-8. Aktywna kaspaza-8 nie białko Bid, a jego C-końcowy fragment (tBid) przemieszcza się do mitochondriów. Zmiany w błonach mitochondrialnych, po przyłączeniu tBid, stymulują uwalnianie cząsteczek cytochromu c i dATP/ATP do cytosolu, w którym wiążą białko adaptorowe Apaf-1, tworząc apoptosom. W wyniku zmian konformacyjnych apoptosomu dochodzi do związania, oligomeryzacji i aktywacji prokaspazy-9. Czynne cząsteczki kaspazy-9 aktywują kaspazy wykonawcze (-3, -6, -7), które dokonują proteolizy białek komórkowych (mogą również aktywować prokaspazę-8), co prowadzi w konsekwencji do załamania strukturalnego i funkcjonalnego komórek oraz ich śmierci

kaspazami (tzw. pętla) biorą udział w proteolizie białkowych substratów komórkowych, co prowadzi do uszkodzenia struktury i funkcji komórek oraz ich śmierci (ryc. 4) [14].

3.2. Udział kaspaz w wewnętrznym mitochondrialnym szlaku apoptozy

W tzw. szlaku wewnętrznym apoptozy funkcje decyzyjne o życiu i śmierci komórek wielu typów przejmują mitochondria. Wśród różnych czynników inicjujących ten szlak wymienia się m.in. wzrost stężenia jonów Ca^{2+} , reaktywnych form tlenu, tlenku azotu, toksyn, zaburzenia transportu elektronów, szok termiczny, uszkodzenia DNA [24, 25, 54, 69]. Sygnały śmierci generują wiele zmian, wśród których jako wczesne wymienia

TABELA 1. Główne substraty kaspaz (kompilacja danych wg [11, 23, 26, 40, 87, 90])

Białka pro-i antyapoptotyczne	Bcl-2, Bcl-X _L , Bid, crmA, FLIP, IAP, p35, prokaspazy
Regulatory cyklu komórkowego	Cdc27, cyklina A, MDM2, p21, p27, białko Rb, kinaza tyrozynowa Wee 1
Białka cyto-i nukleoskieletu	Aktyna, fodryna, gas2, gelsolina, β-katenina, keratyna-18 i -19, plakoglobina, β-2 spektryna, tau, laminy, LBR (receptor lamin), LAP2α (polipeptyd 2α zasocjowany z laminami), nukleoporyna 153 i 270, NUMA (ang. <i>nuclear-mitotic apparatus protein</i>), Ran GAP1 (ang. <i>ran GTP-ase-activating protein 1</i>), SAF-A (ang. <i>scaffold attachment factor A</i>), SATB1 (ang. <i>specific AT-rich sequence binding protein 1</i>)
Białka związane z metabolizmem DNA	Acinus, DNA-PK (ang. <i>DNA-dependent protein kinase</i>), eIF-2α, DFF45/ICAD, MCM3 (czynnik replikacji), PARP, RFC140 białko C kompleksu replikacyjnego, topoizomeraza I
Białka związane z metabolizmem RNA	hnRNP C1 i C2, 70-kDa U1 snRNP
Czynniki transkrypcyjne	GATA-1, NF-κB, NRF-2, SP1, SRE-BP, STAT1
Białka zaangażowan w transmisję sygnału	Ca/MPK IV (ang. <i>Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase IV</i>), FAK (ang. <i>focal adhesion kinase</i>), MEKK1 (ang. <i>MAP/ERK kinase 1</i>), MST/Ksr, kinaza białkowa B/Akt, izoforny kinazy białkowej C δ, θ, ξ, fosfolipaza A2, fosfataza 2A, c-Raf
Prekursory cytokin	Pro-IL-1β, Pro-IL-16, Pro-IL-18
Białka związane z niektórymi chorobami genetycznymi/neurodegeneracyjnymi	Ataksyna-3, atrofina-1, APP (prekursorowe białko amyloidu), huntingtina, preseniliny, receptor androgenowy
Inne	Białka szoku termicznego, DCC (ang. <i>deleted in colorectal cancer</i>), kalpastatyna, transglutaminaza

się otwieranie tzw. megakanalów mitochondrialnych, tworzonych na styku zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondriów. Otwarcie megakanalów prowadzi do obniżenia potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$), spadku syntezy ATP, zmian poziomu związków tiolowych, wzrostu stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej [2, 24]. Zmianom tym towarzyszy wypływ z mitochondrium do cytosolu cytochromu c, opisywanego symbolem Apaf-2 (ang. *apoptosis protease activating factor-2*) oraz innych białek proapoptotycznych: AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein*

with low pI), a także prokaspazy-2, -3 i -9 [17, 20, 25, 50, 70, 83, 91]. Proapoptotyczne białko AIF (m.cz. 57 kDa) o znacznej homologii do oksydoreduktaz kręgowców i bezkręgowców może aktywować prokaspazę-3. Wykazano, że po uwolnieniu do cytosolu czynnik ten może ulec translokacji do jądra komórkowego, w którym przyczynia się do aktywacji określonych endonukleaz, które dokonują fragmentacji DNA do odcinków o długości 50 kpz [83]. Aktualnie przyjmuje się, że uwolniony do cytoplazmy cytochrom c stanowi istotny czynnik promujący powstanie niejednorodnego kompleksu (m.cz. ok. 700 kDa), zwanego apoptosomem – odpowiednika kompleksu DISC w szlaku receptorowym [14, 48, 100]. Apoptosom tworzą cząsteczki cytochromu c, cytosolowego białka Apaf-1 (ang. *apoptosis protease activating factor-1*) i prokaspazy-9, opisywanej symbolem Apaf-3. Utworzenie apoptosomu wymaga dATP lub ATP. Białko Apaf-1 zawiera na C-końcu łańcucha wielokrotnie powtarzającą się sekwencję WDR, którą łączy się z cytochromem c oraz dATP/ATP [5]. Akceptuje się pogląd, że cytochrom c i dATP/ATP funkcjonują jako kofaktory i stymulują oligomeryzację Apaf-1 i jego zmiany konformacyjne [32]. Prokaspaza-9 wiąże się w stosunku 1:1 z domeną werbunku CARD białka Apaf-1, inicjując nagromadzenie cząsteczek tego zymogenu i ich aktywację. Aktywacja prokaspazy-9 w drodze ograniczonej proteolizy może aktywować kaspazę-3 (lub -7), która z kolei albo aktywuje kaskadę kaspaz i/albo dokonuje proteolizy białek komórkowych [14, 36]. Kaspaza-3 może aktywować także inne istotne dla przebiegu apoptozy enzymy, m.in. endonukleazę DFF40/CAD, kalpainę [5, 19, 20, 49].

W przebiegu szlaku mitochondrialnego apoptozy zwraca się uwagę na obniżenie wewnątrzkomórkowego pH. Sugeruje się, że przed uwolnieniem cytochromu c do cytosolu następuje wypływ jonów K^+ i Cl^- . Stwierdzono, że prokaspaza-3 podlega aktywacji przez kaspazę-9, aby jednak proces ten miał miejsce, pH nie może przekraczać wartości 7,4. Powyżej tej wartości pH aktywacja prokaspazy-3 jest hamowana [74].

3.3. Białko Bid jako łącznik szlaku receptorowego i mitochondrialnego

W 1998 r. wykryto, że w niektórych typach komórek, które realizują program śmierci, może dochodzić do połączenia szlaku receptorowego i mitochondrialnego za pośrednictwem białka należącego do rodziny Bcl-2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*) – Bid [47], które ulega proteolitycznemu cięciu przez kaspazę-8 [32, 40, 79, 80]. Obecnie poznano w miarę szczegółowo ten szlak sygnalizacyjny. Transmisja sygnału śmierci poprzez receptory prowadzi do powstania kompleksu DISC, w którym dochodzi do aktywacji kaspazy-8, a w dalszej kolejności do rozszczepienia białka Bid (m.cz. 21950, 195 aminokwasów) po reszcie Asp⁵⁹ [72, 80]. Skrócony polipeptyd, opisywany jako Bid p15 lub tBid (ang. *truncated Bid*), wiąże się następnie z białkiem Bax (lub białkiem podrodziny Bax), co prowadzi do jego zmian konformacyjnych, głównie w N-końcu cząsteczki. Przyłączenie tak zaktywowanych cząsteczek Bax do powierzchni mitochondriów jest odpowiedzialne za formowanie porów w błonie, przez które uwalnia się cytochrom c, a następnie powstaje apoptosom. Wykrycie molekularnego łącznika ścieżek zewnętrznej i wewnętrznej apoptozy, jakim jest C-końcowy odcinek białka

Bid, zainicjowało podział komórek apoptotycznych na dwa typy (ryc. 4) [14, 73]. Do I typu zalicza się komórki, które po otrzymaniu sygnału inicjowanego reakcją ligand-receptor (np. FasL-Fas) generują kompleks DISC i natychmiastową aktywację znacznej liczby cząsteczek prokaspazy-8, które prowadzą efektywną i bezpośrednią aktywację kaspaz wykonawczych -3, -6 czy -7. Natomiast w komórkach typu II (np. komórki Jurkat, hepatocyty) tworzenie kompleksu DISC przebiega wolniej, co powoduje zmniejszoną i opóźnioną aktywację prokaspazy-8. Aktywny enzym dokonuje rozszczepienia białka Bid i włącza w przekaz sygnału śmierci czynniki mitochondrialne. Na podkreślenie zasługują wyniki badań wskazujące, że ufosforylowane przez kinazę kazeinową I i II białko Bid zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* nie ulega proteolizie przez kaspazę-8. Wyniki badań sugerują, że modyfikacja białka Bid przez fosforylację/defosforylację jest prawdopodobnie ważnym czynnikiem regulującym apoptozę w komórkach typu II [15].

3.4. Rola kaspaz w apoptozie indukowanej stresem

Wśród ostatnich doniesień dotyczących sygnalizacji apoptotycznej komórek wymienia się szlak indukowany stresem, opisany przez zespół J. Yuan w 2000 r. [59]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że sygnał śmierci w tym szlaku jest generowany w siateczce śródplazmatycznej – ER (ang. *endoplasmic reticulum*) jako efekt zaburzenia homeostazy jonów Ca^{2+} i nagromadzenia się w jej strukturze licznych cząsteczek białek, które uległy niewłaściwym modyfikacjom potranslacyjnym i/lub błędnemu pofałdowaniu, co utrudnia ich eksport poza ER [40, 58]. Czynniki te aktywują cząsteczki prokaspazy-12, enzymu inicjującego ten szlak, zlokalizowanego po cytosolowej stronie ER, stymulując przekaz sygnału śmierci bezpośrednio lub pośrednio na białka efektorowe i kaspazy wykonawcze [26, 40]. Nakagawa i wsp. [58] donieśli, że w aktywacji prokaspazy-12 może również uczestniczyć proteaza cysteinowa – kalpaina. Inny mechanizm aktywacji zymogenu kaspazy-12 uwzględnia możliwość tworzenia kompleksu z kaspazą-7, która pod wpływem stresu ulega przemieszczeniu z cytosolu do siateczki śródplazmatycznej [62]. Kaspaza-7 wiążąc się z prodomoną prokaspazy-12 powoduje jej usunięcie i powstanie aktywnej formy enzymu, która może bezpośrednio lub pośrednio aktywować kaspazy wykonawcze, chociaż ten sposób aktywacji jest wciąż mało poznany.

Odkrycie szlaku indukowanego czynnikami stresowymi oraz udziału w nim kaspaz może dostarczyć wielu nowych informacji i stanowić przełom w leczeniu niektórych schorzeń, np. choroby Alzheimer, w której sugeruje się, że właśnie ta ścieżka jest odpowiedzialna za apoptozę neuronów [59]. Do śmierci tych komórek przyczynia się m.in. niewłaściwe proteolityczne rozszczepienie przez kaspazy (w tym kaspazę-12) prekursorowego białka amyloidu – APP (ang. *amyloid precursor protein*) i presenilin [40, 59].

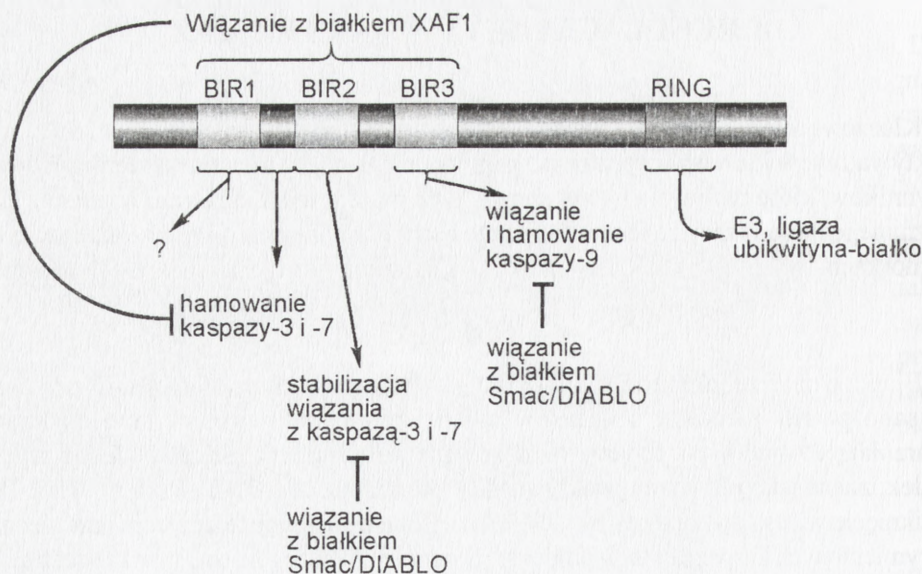
4. REGULACJA AKTYWNOŚCI KASPAZ

Kluczową rolę w regulacji aktywności kaspaz odgrywają naturalne białkowe inhibitory i aktywatory, w które są wyposażone komórki ulegające samounicestwieniu. Wśród czynników, które wpływają na aktywność tych proteaz cysteinowych, wymienia się poznane jedynie w zarysie ich modyfikacje potranslacyjne, jak również lokalizację w komórkach.

4.1. Białka IAP

Białka o naturze inhibitorów apoptozy – IAP (ang. *inhibitor of apoptosis protein*) opisano po raz pierwszy u wirusów owadzich – bakulowirusów jako czynniki ochraniające komórki gospodarza zainfekowane wirusami przed śmiercią. Jedno z tych białek, znane jako p35, hamuje aktywność kilku kaspaz (-1, -3, -6, -7, -8, -10) [7]. Po wnikięciu wirusa do komórek żywiciela inhibitor ten ulega rozszczepieniu przez jedną z wymienionych kaspaz, a wtedy produkty jego proteolitycznego cięcia tworzą tioestrowe wiązania z docelową kaspazą, powodując jej inaktywację [96]. Kolejny wirusowy inhibitor apoptozy (wirusa krowianki) — crmA (ang. *cytokine response modifier A*) blokujący aktywność kaspazy-1, -8, i -10 reprezentuje inhibitor proteaz serynowych (serpina). Działa jako pseudosubstrat, który wiąże wspomniane kaspazy [85].

Dalsze badania wykazały powszechne występowanie homologów wirusowych inhibitorów apoptozy zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców [16]. Dotychczas u ssaków zidentyfikowano szereg białek IAP (XIAP, HIAP1, HIAP2, NAIP, surwiwina, liwina) [33, 75]. Aktualnie panuje pogląd, że białka IAP zakłócają przekazywanie sygnału apoptotycznego (czy przeżycia) przez tworzenie kompleksów między nimi a białkami uczestniczącymi w realizacji programu apoptozy, tj. głównie z kaspazami, ale również z białkami adaptorowymi, np. TRAF (ang. *TNF-R1 associated factor*), czynnikiem transkrypcyjnym NFκB, czy białkami blokującymi ich aktywności [28, 33, 66]. Białka IAP są zbudowane z łańcuchów o zróżnicowanej długości (150–1500 aminokwasów) [28]. Charakteryzuje je obecność dwóch motywów sekwencyjnych: w N-końcu cząsteczki domena BIR (ang. *baculoviral IAP-like repeats*) oraz w C-końcu domena RING (ang. *really interesting new gene*) o strukturze palca cynkowego, wykazująca aktywność ligazy E3 ubikwityna-białko [33, 97]. Domenę BIR, która w niektórych białkach IAP występuje w powtórzeniach (1–3), tworzy 65–80 reszt aminokwasowych, wśród których zidentyfikowano motywy sekwencji CysX₂Cys i CysX₆His, sugerujące, że białka te mogą wiązać jony Zn²⁺. W opisanych dotąd białkach IAP domeny BIR i RING łączy odcinek o różnej długości, zwany łącznikiem. Dotychczas najlepiej poznano strukturę i sposób działania najefektywniejszego inhibitora apoptozy komórek ludzkich, związanego z chromosomem X – białka XIAP (ang. *X-chromosome linked inhibitor of apoptosis*) [33, 75]. Zawiera ono trzy domeny BIR i może hamować niezależnie kaspazy wykonawcze i inicjującą kaspazę-9 (ryc. 5). Wnikliwe analizy wykazały, że domena BIR-2 hamuje aktywność kaspaz: -3 i -7, ale wymaga również obecności łącznika, poprzedzającego tę domenę [84]. Wyniki



RYCINA 5. Regulacja aktywności kaspaz: -3, -7 i -9 z udziałem białka XIAP oraz Smac/DIABLO (wg [33], zmodyfikowana). Białko XIAP poprzez domenę BIR2 i BIR3 może wiązać się odpowiednio z kaspazą-3, -7 oraz kaspazą-9, co prowadzi do hamowania aktywności tych enzymów. Natomiast białko Smac/DIABLO – inhibitor białek IAP przez wiązanie z domeną BIR2 i BIR3 białka XIAP zapobiega interakcji tego inhibitora z kaspazami i promuje apoptozę komórek

badania struktury kryształu kaspazy-7 skompleksowanej z odcinkiem hamującym jej aktywność w XIAP (między 124. a 240. aminokwasem) sugerują, że fragment ten wiąże się z katalitycznym miejscem enzymu, umieszczonym w rowku i w pełni go wypełniającym, co uniemożliwia wiązanie innych substratów. Podobne wyniki otrzymano dla interakcji XIAP z kaspazą-3. Określono, że 4-aminokwasowy motyw XIAP, tj. Gly¹⁴⁴-Val¹⁴⁶-Val¹⁴⁷-Asp¹⁴⁸ oddziałuje z kaspazą-7 poprzez wiązania wodorowe czy za pomocą sił van der Waalsa, w miejscach interakcji enzymu z substratami. Kluczową funkcję w tych oddziaływaniach pełni Asp¹⁴⁸ [33]. Domena BIR2 stabilizuje ponadto interakcje XIAP - kaspazy wykonawcze, a także pośredniczy w oddziaływaniach z innymi polipeptydami, np. Smac/DIABLO [17, 91]. Z kolei domena BIR3 wiąże się z inicjującą kaspazą-9 i hamuje jej aktywność [82]. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że XIAP nie wchodzi w interakcje z zymogenem kaspazy-9 [78]. Aktywacja kaspazy-9 wiąże się w pierwszej kolejności z rozszczepieniem jej formy nieaktywnej po Asp³¹⁵ i uwolnieniem podjednostki mniejszej. W tej podjednostce motyw sekwencyjny: Ala³¹⁶-Thr³¹⁷-Pro³¹⁸-Phe³¹⁹ oddziałuje z domeną BIR3 białka XIAP. Ten stan zakłóca połączenie podjednostki mniejszej i większej kaspazy-9 i możliwość oligomeryzacji enzymu. Okazało się, że w komórkach apoptotycznych może ulec rozszczepieniu kaspaza-9 np. przez kaspazę-3 po Asp³³⁰, powodując usunięcie 15-aminokwasowego segmentu enzymu, zawierającego sekwencję rozpoznawaną przez

białko inhibitorowe i wtedy zwykle zostaje uruchomiona kaskada kaspaz [78]. Dotychczas niewiele wiadomo o funkcji domeny BIR1. Przypuszcza się, że może ona uczestniczyć w stabilizacji XIAP bądź stanowi region oddziaływań z innymi wciąż słabo poznanymi białkami o powinowactwie do inhibitora, np. XAF1 (ang. *XIAP associated factor 1*) lub z kaspazami czy innymi białkami dotąd niezidentyfikowanymi [33]. Okazało się, że XIAP wykazuje zdolność przyłączenia się do apoptosomu. W takim złożonym kompleksie białko XIAP wiąże się zarówno z kaspazą-9, jak i -3 i przez to nie tylko zapobiega aktywacji tej ostatniej przez inicjującą kaspazę-9, ale też uniemożliwia usunięcie kaspazy-3 z apoptosomu [6].

Skomplikowany mechanizm regulacji aktywności kaspaz został w znacznej części wyjaśniony dzięki wykryciu w 2000 r. białka Smac/DIABLO [17, 91]. Uważa się, że polipeptyd ten oddziałując z białkami IAP zapobiega ich interakcji z kaspazami i promuje apoptozę komórek. Wyniki doświadczeń wskazują, że prekursorowa postać Smac/DIABLO (239 aminokwasów) ulega translokacji z cytosolu do mitochondriów, tracąc *N*-końcową 55-aminokwasową sekwencję lokalizacji w tych strukturach. Utrata tego odcinka białka udostępnia 4-aminokwasowy motyw: Ala-Val-Pro-Ile, istotny w oddziaływaniach z białkami IAP. Ten krótki fragment „rozpoznaje” np. domenę BIR3 białka XIAP, a alanina tego motywu wiąże się z hydrofobową kieszenią inhibitora przez wiązania wodorowe z sąsiadującymi aminokwasami białka XIAP. Okazało się ponadto, że Trp³¹⁰ i Glu³¹⁴ białka XIAP, aminokwasy istotne w wiązaniu i hamowaniu kaspazy-9, pośredniczą w jego oddziaływaniu z białkiem Smac/DIABLO [50, 78]. Polipeptyd ten wchodzi w interakcje z kaspazami, dodatkowo je stabilizując, co powoduje, że zainicjowany proces apoptozy jest nieodwracalny. Doświadczenia *in vitro* potwierdziły, że Smac/DIABLO oddziałuje poza XIAP z białkami HIAP1, HIAP2 i surwiwiną. W przypadku XIAP dochodzi do interakcji przez domeny BIR2 i BIR3 (ryc. 5) [33]. Białko Smac/DIABLO jest aktywne w formie dimeru (długość 130 Å), w którym monomery łączą się ze sobą i przyjmują kształt zwieńczonej łukiem bramy [75]. Taki dimeryczny kompleks wiąże się z białkami IAP, np. XIAP oraz kaspazami.

Badania apoptozy w komórkach muszki owocowej doprowadziły do identyfikacji homologów białek IAP, tj. DIAP1 i DIAP2, które wiążą się z kaspazami, prowadząc do ich inaktywacji [38, 75]. Stwierdzono, że np. białko DIAP1 zawiera dwie domeny BIR, jednakże tylko obecność BIR2 wystarcza do blokowania apoptozy [92]. Szeroko zakrojone analizy apoptozy tkanek *Drosophila melanogaster* podczas embriogenezy umożliwiły identyfikację białek Hid, Grim i Reaper, które wchodzi w interakcję z domeną BIR2 polipeptydu DIAP1 i blokują jego aktywność jako inhibitora kaspaz [92]. Analiza motywów sekwencyjnych wiążących białka IAP, wśród polipeptydów hamujących ich funkcję jako inhibitorów apoptozy, tj. Hid, Grim, Reaper u owadów i Smac/DIABLO u ssaków, wskazuje na pewną homologię funkcjonalną, a niewielką homologię sekwencyjną [75].

W 2002 r. Hedge i wsp. [31] opublikowali wyniki doświadczeń wskazujące na występowanie w komórkach apoptotycznych (komórki ludzkie 293) kolejnego czynnika regulującego aktywność kaspaz. Jest nim proteaza serynowa – Omi/HtrA2 (ang. *high temperature requirement protein A2*), która po zsyntetyzowaniu przemieszcza się do

mitochondriów [53.]. Uruchomienie apoptozy na szlaku mitochondrialnym powoduje wpływ z przestrzeni międzybłonowej tych struktur do cytosolu kilku białek proapoptotycznych, w tym białka Omi/HtrA2. W cytosolu białko to oddziałuje z domeną BIR-3 inhibitora aktywności kaspaz – XIAP, poprzez sekwencję Ala-Val-Pro-Ser, znajdującą się w *N*-końcu łańcucha, co prowadzi do wzmożenia aktywności tych proteaz [31].

Jak dotąd, w szerszym zakresie poznano regulację aktywności kaspaz z udziałem omówionych wyżej białek na szlaku mitochondrialnym, a także w komórkach typu II. Przedstawiono również wyniki badań wskazujące, że enzymy te na szlaku receptorowym apoptozy podlegają kontroli z udziałem białkowych inhibitorów pochodzenia wirusowego i komórkowego, oznakowanych jako v- lub c-FLIP (ang. *viral-; cellular Flice inhibitory protein*). Okazało się, że białka v-FLIP zawierają dwie domeny DED, przez które wiążą się z kompleksem DISC uniemożliwiając aktywację prokaspazy-8 [44]. Homologi v-FLIP w komórkach ssaków opisywano w różnych laboratoriach następującymi nazwami: usurpina, FLAME1, I-FLICE, Casper, CASH, MRIT, CLARP [27, 93]. Określono lokalizację genu c-FLIP na chromosomie 2q33-34, w regionie obejmującym około 200 kbp, wspólnie z genem kodującym kaspazę-8 i -10, co sugeruje, że geny te ewoluowały przez duplikację [44]. Transkrypcja genu dostarcza kilku wariantów mRNA, z których dwa kodują tzw. długą (ang. *long*) i krótką (ang. *small*) postać polipeptydu, opisywaną jako FLIP_L i FLIP_S. W strukturze pierwszorzędowej FLIP_L odnotowano znaczną homologię z prokaspazą-8, m.in. obecność dwóch domen DED. Jednakże FLIP_L nie ma centrum katalitycznego. Z kolei białko FLIP_S zawiera dwie domeny DED, w czym przypomina v-FLIP, oraz krótki segment *C*-końcowy różniący je od FLIP_L. Aktualnie akceptuje się pogląd, że białka FLIP sprawują swoje funkcje przez bezpośrednie oddziaływanie z białkami szlaków apoptotycznych, np. z kaspazą-8/-10, -3, a także z białkami adaptorowymi, np. FADD, TRAF1 i TRAF2. Jeden z mechanizmów ich działania zakłada interakcję FLIP_L z białkiem FADD w kompleksie DISC, uniemożliwiający wiązanie z nim prokaspazy-8 i jej następczą aktywację [44, 93]. Z kolei cząsteczki FLIP_S wydają się oddziaływać bezpośrednio z prokaspazą-8, hamując możliwość jej aktywacji.

4.2. Inne polipeptydy

Wśród polipeptydów, które wpływają na aktywność kaspaz, należą białka rodziny Bcl-2. Dotąd poznano kilkunastu członków tej rodziny o odmiennych funkcjach, tj. inhibitorów i aktywatorów apoptozy [9, 64]. Budowę tych białek, a także strukturę kodujących je genów, w znacznym stopniu rozszyfrowaną, przedstawiono w licznych pracach przeglądowych w języku angielskim [1, 9, 42, 88] i polskim [29, 40a, 56, 65, 67–69]. W niniejszym opracowaniu zostaną podkreślone te aktywności białek rodziny Bcl-2, które okazują wpływ na aktywność kaspaz. Wśród postulowanych mechanizmów działania białek Bcl-2 należy zwrócić uwagę na ich udział w regulacji spadku potencjału błonowego mitochondriów i promowaniu wpływu z przedziału międzybłonowego czynników apoptotycznych (cytochromu *c*, AIF, prokaspaz, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2) [17, 20, 42, 77, 83, 89], które uczestniczą w przekazie sygnału śmierci na

szlaku mitochondrialnym. W antyapoptotycznym działaniu białek, np. Bcl-2 czy Bcl-X_L rozpatruje się ich bezpośrednie oddziaływanie z białkiem adaptorowym Apaf-1, kluczowym składnikiem apoptosomu [34]. W przypadku białka Bcl-X_L wykazano jego wiązanie z białkiem CED-4 *C.elegans* i jego homologiem u ssaków – Apaf-1, uniemożliwiające powstanie oligomerów kompleksu CED-4/Apaf-1–CED-3/pro-kaspaza-9. To wiązanie zapobiega aktywacji zymogenu kaspazy-9 albo wewnątrz potrójnego kompleksu: kaspaza-9/Apaf1/Bcl-X_L albo przez rozbicie wiązania Apaf-1–kaspaza-9. W pośrednim oddziaływaniu białek antyapoptotycznych, np. Bcl-2 lub Bcl-X_L, z Apaf-1 rozważa się, że białka te funkcjonujące w błonie zewnętrznej mitochondriów, zapobiegają wypływowi z tych struktur cytochromu c, istotnego czynnika oligomeryzacji białka Apaf-1 i aktywacji zymogenu kaspazy-9, a następnie aktywacji kaspazy-3 [48].

Na przebieg apoptozy istotny wpływ wykazuje wykryte w 2001 r. białko Aven (m.cz. 55 kDa) zdolne do interakcji z czynnikiem Apaf-1 [12]. Wyniki doświadczeń ujawniły, że białko to hamuje formowanie oligomerów Apaf-1, osłabiając przez to aktywację prokaspazy-9. Badania, w których użyto ekstraktów komórek 239T, transfekowane wektorem zawierającym cDNA białka Aven (lub wektorem kontrolnym), w obecności egzogennie wprowadzonego cytochromu c i dATP wykazały, że komórki te nie były zdolne do aktywacji zymogenów kaspazy-9 ani kaspazy-3 w tych próbach, w których miała miejsce ekspresja Aven [12].

Wśród rodziny białek szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*; hsp), uchodzących za czynniki ochraniające komórki przed apoptozą [71] wykazano, że jeden z nich – hsp70 blokuje aktywację zymogenu kaspazy-9 w komórkach Jurkat, indukowanych do apoptozy podwyższoną temperaturą (42°C, 45 min.). Białko hsp70 wchodzi w interakcje z czynnikiem Apaf-1, uniemożliwiając napływ cząsteczek prokaspazy-9 do powstającego apoptosomu i powstanie jego czynnej postaci [3].

4.3. Lokalizacja

Badania lokalizacji nieaktywnych kaspaz wykazały, że są one rozmieszczone zwykle w pewnej odległości od ich substratów, co zapobiega przypadkowej śmierci. Aktywacja enzymów tej rodziny w komórkach, które wkroczyły na drogę apoptozy najczęściej doprowadza do ich przemieszczania się w kierunku substratów – białek określonych struktur komórkowych [11, 99]. Prokaspaza-8, funkcjonująca przede wszystkim na tzw. szlaku receptorowym apoptozy, występuje w cytosolu, w którym zostaje związana w kompleks DISC, po otrzymaniu sygnału śmierci. Prokaspaza-2 występuje zarówno w cytosolu, jak i w jądrach komórkowych. W pokonaniu bariery jądrowo-cytoplazmatycznej enzymu wykorzystywana jest jej N-końcowa prodomena [13]. Wiele badań potwierdziło cytosolowe rozmieszczenie kaspazy-8 oraz lokalizację prokaspazy-9 w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, w której odnajduje się również zymogeny kaspazy-2 i -3 [43, 70, 83]. Zmiany w komórkach apoptotycznych prowadzą do otwierania megakanatów mitochondrialnych bądź rozrywania błony zewnętrznej tych struktur, w wyniku czego następuje wypływ do cytosolu prokaspaz oraz białek proapoptotycznych (AIF, cytochrom c, Smac/DIABLO). Ostatnio wykazano, że w komórkach

nabłonkowych myszy linii 31D i HC11 prokaspaza-9 nagromadza się poza mitochondriami w jądrach tych komórek [63].

W 2000 r. doniesiono, że kaspazy mogą „zakłócać” barierę jądrowo-cytoplazmatyczną w komórkach apoptotycznych przez wzrost dyfuzji przez pory jądrowe [21]. Wydaje się, że w komórkach apoptotycznych kaspaza-9, ulegająca wcześniej aktywacji niż kaspaza-3, bezpośrednio lub pośrednio hamuje transport jądrowy, powodując zwiększony wypływ przez pory jądrowe. W takiej sytuacji mogą napływać (bądź wypływać) do jąder komórek cząsteczki kaspazy-3 i innych biomolekuł. Jądrowa lokalizacja, szczególnie kaspazy-3, tłumaczy jej aktywność w degradacji tych organelli przez aktywację m.in. endonukleazy DFF40/CAD czy w proteolizie niektórych białek matriksu jądrowego [18, 19, 49]. Kaspaza-12 występuje w siateczce śródplazmatycznej, inicjując szlak apoptotyczny indukowany stresem [58, 59]. W komórkach wątroby myszy prokaspaza-3 jest zlokalizowana w cytosolu i w mitochondriach, podczas gdy prokaspaza-7 tylko w cytosolu. Po indukcji apoptozy z udziałem receptora Fas kaspazę-3 odnajdywano głównie w cytosolu, podczas gdy kaspazę-7 – we frakcji mikrosomalnej [10, 11].

4.4. Modyfikacje potranslacyjne kaspaz

Aktywność kaspaz podlega dodatkowo regulacji przez potranslacyjne modyfikacje (fosforylacja i nitrozyłacja) [11]. Okazało się, że fosforylacja kaspazy-9 przez kinazę białkową B/Akt i kinazę p21 Ras hamuje jej proteolityczne dojrzewanie, w którym uczestniczy również cytochrom c [8].

S-nitrozyłacja cysteiny centrum aktywnego kaspaz stanowi kolejną ich modyfikację. Tlenek azotu i związki pokrewne zaangażowane w tę modyfikację są znanymi czynnikami indukującymi bądź hamującymi apoptozę (zależność od ich stężenia, typu komórki) [11]. Antyapoptotyczne działanie tych związków wiąże się z ich udziałem w nitrozyłacji cysteiny centrum aktywnego kaspaz, która efektywnie blokuje ich katalityczną funkcję, co jak dotąd wykazano w przypadku kaspazy-3 [54].

5. UWAGI KOŃCOWE

Od 1993 r., kiedy po raz pierwszy udowodniono udział kaspaz w przebiegu apoptozy, wykazując, że produkt białkowy jednego z genów *C. elegans* – Ced-3 cechuje znaczna homologia sekwencyjna z proteazą cysteinową ICE-1 β , panuje pogląd, że enzymy tej rodziny pełnią kluczową rolę w procesie apoptozy [11, 40, 79, 98]. Chociaż kaspazy, obok endonukleaz [57, 64, 94, 99], wciąż uznaje się za podstawowe „narzędzia wykonawcze” dokonujące degradacji głównych składników komórek ulegających apoptozie, to należy wspomnieć o sygnałnych doniesieniach wskazujących na niezależną od kaspaz drogę śmierci [4, 41]. Wprowadzenie nowych syntetycznych inhibitorów kaspaz zwiększyło możliwości szerokiej analizy procesu śmierci programowanej,

ujawniając m.in., że komórki, w których indukowano apoptozę (m.in. staurosporyną czy przeciwciałami skierowanymi przeciwko receptorom powierzchniowym) z równoczesnym blokowaniem aktywności kaspaz, nabywają cech morfologicznych przypominających nekrozę (ang. *necrotic-like*) [20]. W komórkach tych odnotowuje się tylko częściową kondensację chromatyny, której nie towarzyszy fragmentacja DNA; nie powstają również ciała apoptotyczne [41]. Aktualnie lansuje się pogląd, że kaspazy, które pełnią istotną rolę w procesie apoptozy większości komórek, nie są wyłącznymi enzymami dokonującymi proteolizy głównych białek komórkowych. W apoptotycznej degradacji składników białkowych zapewne ważną rolę mogą pełnić niektóre proteazy, m.in. proteaza A24, kalpaina, katepsyny [20, 80], czy wykryte ostatnio białko Omi [31, 53]. Wydaje się, że decyzja o „wejściu” komórek na szlak apoptozy i zaangażowaniu w proteolizę określonych enzymów zależy od ich typu oraz rodzaju i siły bodźców inicjujących proces [4, 41].

W niniejszym opracowaniu zogniskowano uwagę na przedstawieniu przeglądu danych dotyczących kaspaz komórek zwierzęcych. Słabo poznana „maszyna” śmierci programowanej komórek roślinnych [95] wydaje się również wciągać kaspazopodobne proteazy cysteinowe w inicjowanie i przebieg procesu, lecz mechanizm ich działania pozostaje w dalszym ciągu niewyjaśniony.

LITERATURA

- [1] ANTONSSON B, MARTINOUC J. The Bcl-2 protein family. *Exptl Cell Res* 2000; **256**: 50–57.
- [2] BARTOSZ G. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Biochem* 1998; **44**: 22–31.
- [3] BEERE HM, WOLF BB, CAIN K, MOSSER DD, MAHBOUHI A, KUWANA T, TAILOR P, MARIMOTO RI, COHEN GM, GREEN DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 469–475.
- [4] BORNER C, MONNEY L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular gillotine? *Cell Death Differ* 1999; **6**: 497–507.
- [5] BRATTON SB, MACFARLANE M, CAIN K, COHEN MG. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; **256**: 27–33.
- [6] BRATTON SB, WALKER G, SRINIVASULA SM, SUN XM, BUTTERWORTH M, ALNEMRI ES, COHEN GH. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complex. *EMBO J* 2001; **20**: 998–1009.
- [7] BUMP NJ, HACKETT M, HUGUNIN M, SESHAGIRI S, BRADY K, CHEN P, FERENZ C, FRANKLIN S, GHAYUR Y, LI P, LICARI P, MANCOVICH J, SHI L, GREENBERG AH, MILLER L, WONG WW. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995; **269**: 1885–1888.
- [8] CARDONE MH, ROY N, STENNICKE HR, SALVESEN GS, FRANKE TF, STANBRIDGE E, FRISCH S, REED JC. Regulation of caspase by phosphorylation. *Science* 1998; **282**: 1318–1321.
- [9] CEPERO E, JOHNSON BW, BOISE LH. Cloning and analysis of Bcl-2 family genes. *Methods in Cell Biology* 2001; **66**: 29–47.
- [10] CHANDLER JM, COHEN GM, MACFARLANE M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10815–10818.
- [11] CHANG YH, YANG H. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; **64**: 821–846.

- [12] CHAU BN, CHENG EHY, KERR DA, HARDWICK JM. Aven, a novel inhibitor of caspase activation binds Bcl-xl and Apaf-1. *Molec Cell* 2000; **6**: 31–40.
- [13] COLLUSI PA, HARVEY NL, KUMAR S. Prodomain-dependent nuclear localization of caspase-2 (Nedd2) precursor: a novel function for a caspase domain. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24535–24542.
- [14] DENECKER G, VERCAMMEN D, DECLERCQ W, VANDENABEELE P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 356–370.
- [15] DESAGHER S, OSTEN-SAND A, MONTESSUIT S, MAGNENAT E, VILBOIS F, HOCHMANN A, JOURNOT L, ANTONSSON B, MARTINOU JC. Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase-8. *Mol Cell* 2001; **8**: 601–611.
- [16] DEVERAUX QL, REED JC. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Rev* 1999; **13**: 239–252.
- [17] DU C, FANG M, LI Y, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrom c -dependent caspase activation during apoptosis. *Cell* 2000; **102**: 33–42.
- [18] DYNLACHT JR, ROBERTS ZV, EARLES M, HENTHORN J, SENO JD. Different patterns of DNA fragmentation and degradation of nuclear matrix proteins during apoptosis induced by radiation, hyperthermia or etoposide. *Radiat Res* 2000; **154**: 515–530.
- [19] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**: 43–50.
- [20] FADEEL B, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000; **14**: 1514–1525.
- [21] FALEIRO L, LAZEBNIK Y. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* 2000; **151**: 951–959.
- [22] GRANVILLE JD, CARTHY MC, HUNT VCD, MCMANUS MB. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Inv* 1998; **78**: 893–913.
- [23] GRAVES J, YANKEE T, DRAVES K, CLARK E, KREBS E. Caspases: a signal transduction perspective. *IOS Press* 2001.
- [24] GRĄDZKA J. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 1999; **46**: 2–16.
- [25] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312.
- [26] GRÜTTER MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Cur Op Struct Biol* 2000; **10**: 649–655.
- [27] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–20.
- [28] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek. *Post Biochem* 1999; **54**: 167–176.
- [29] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 9–43.
- [30] GUPTA S. Apoptosis / programmed death. A historical perspective. *Adv Exp Med Biol* 1996; **406**: 1–9.
- [31] HEGDE R, SRINIVASULA SM, ZHANG Z, WASELL R, MUKATTASH R, CILENTI L, DUBOIS G, LAZEBNIK Y, ZERVOS AS, FERNANDES-ALNEMRI T, ALNEMRI ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; **277**: 432–438.
- [32] HENGARTNER OM. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; **407**: 770–776.
- [33] HOLCIK M, KORNELUK GR. XIAP, the guardian angel. *Mol Cell Biol* 2001; **2**: 550–556.
- [34] HU Y, BENEDICT MA, WU D, INOHARA N, NUNEZ G. Bcl-X_L interact with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 4386–4391.
- [35] HUGHES MF, EVANS-STORMS BR, CIDLOWSKI AJ. Evidence that non-caspase proteases are required for chromatin degradation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 1017–1027.
- [36] HUPPERTZ B, FRANK GH, KAUFMANN P. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embriol* 1999; **200**: 1–18.
- [37] JANIĄK MK, WREMBEL-WARGOCKA J, CHEDA A. Apoptoza popromienna – mechanizm, rola biologiczna i możliwość wykorzystania w terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 1998; **26**: 267–283.
- [38] KAISER W, VUCIC D, MILLER L. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis DIAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE. *FEBS lett* 1998; **440**: 243–248.
- [39] KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.

- [40] KIDD JV, LAHTI MJ, TEITZ T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Cell Develop Biol* 2000; **11**: 191–201.
- [40a] KILIAŃSKA ZM. Apoptoza organizmów eukariotycznych. [w] Kłyszajko-Stefanowicz L. Cytobiochemia Warszawa; PWN 2002: 772–814.
- [41] KITANAKA C, KUCHINO Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 508–515.
- [42] KORSMEYER SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulatory of cell death. *Blood* 1992; **80**: 879–886.
- [43] KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, ELLERBY LM, WELSH K, XIE Z, DEVERAUX QL, SALVESEN GS, BREDESEN DL, ROSENTHAL RE, FISKUM G, REED JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5752–5757.
- [44] KRUEGER A, BAUMANN S, KRAMMER HP, KIRCHHOFF S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediator apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8247–8254.
- [45] KRUIDERING M, EVAN IG. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of „The end”? *Life* 2000; **50**: 85–90.
- [46] LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; **371**: 346–347.
- [47] LI H, ZHU H, XU C-J, YUAN J. Cleavage of Bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; **94**: 491–501.
- [48] LI P, NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997 **91**: 479–489.
- [49] LIU X, ZOU H, SLAUGHTER G, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; **89**: 175–184.
- [50] LIU Z, SUN C, OLEJNICZAK ET, MEADOWS RP, BETZ SF, OOST T, HERRMANN J, WU JC, FESIÁK SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the IAP BIR3 domain. *Nature* 2000; **408**: 1004–1008.
- [51] MARTIN DA, SIEGEL RM, ZHENG L, LEONARDO MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpal) death signal. *J Biol Chem* 1998; **273**: 4345–4349.
- [52] MARTIN SJ, REUTELINGSPERGER CPM, MCGAHON AJ, RADER JA, VAN SCHIE RCA, LAFACE DH, GREEN DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidyl-serine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. *J Exp Med* 1995; **182**: 1545–1556.
- [53] MARTINS LM, IACCARINO I, TENEV T, GSCHMEISSNER S, TOTTY NF, LEMOINE NR, SAVOPOULOS J, GRAY CW, CREAMY CL, DINGWALL C, DOWNWARD J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 2002; **277**: 439–444.
- [54] MIGITA K, YAMASAKI S, KITA M, IDA H, SHIBATOMI K, KAWAKAMI A, AOYAGI T, EGUCHI K. Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis by inhibiting caspase-3. *Immunology* 2001; **103**: 362–367.
- [55] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 315–334.
- [56] MOTYL T, GAJKOWSKA B, PŁOSZAJ T, WAREŚKI P, ORZECZOWSKI A, ZIMOWSKA W, WOJEWÓDZKA U, RYNIWICZ Z, REKIEL A. Rola Bax i Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 31–51.
- [57] NAGATA S. Apoptosis. *Fibrynol Proteol* 2000; **14**: 82–86.
- [58] NAKAGAWA T, YUAN J. Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; **150**: 887–894.
- [59] NAKAGAWA T, ZHU H, MORISHIMA N, LI E, XU J, YANKER AB, YUAN J. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 2000; **403**: 98–103.
- [60] NICHOLSON DW, THORNBERRY NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 299–306.
- [61] PERPINA-ESTEBANEZ E, PRIOR-FUENTEZ P, BELORGEY D, BRAUN M, KIEFERSAUER R, MASKOS K, HUBER R, RUBIN H, BODE W. Crystal structure of caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue. *Biol Chem* 2000; **381**: 1203–1214.
- [62] RAMMONAN V, RAOS VR, HERMEL E, CASTRO-OBREGON S, DEL RIO G, ELLERBY ML, ELLERBY M, BREDESEN ED. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001 **276**: 33869–33874.
- [63] RITTER MP, MARTI A, BLANC C, BALTZER A, KRAJEWSKI S, REED CJ, JAGGI R. Nuclear localization of procaspase-9 and processing by a caspase-3-like activity in mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 2000; **79**: 358–364.

- [64] ROBERTSON JD, ORRENIUS S. Molecular mechanism of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 2000; **30**: 609–627.
- [65] ROLIŃSKI J. Apoptoza w układzie odpornościowym – rola Fas, bcl-2 i interleukiny 2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 561–574.
- [66] ROY N, DEVERAUX QL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; **16**: 6914–6925.
- [67] ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 303–318.
- [68] ROŻYŃKOWA D, FILIP A. Endogenne białka przeciwdziałające apoptozie. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 561–578.
- [69] RUPNIEWSKA M, ROŻYŃKOWA D, KUROWSKA M. Rodzina genów Bcl-2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 33–47.
- [70] SAMALI A, CAI J, ZHIVOTOVSKY B, JONES DP, ORRENIUS S. Presence of a pro-apoptotic complex of procaspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *EMBO J* 1999; **18**: 2040–2048.
- [71] SAMALI A, ORRENIUS S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 1998; **3**: 228–236.
- [72] SCAFFIDI C, FULDA S, SRINIVASAN A, FRIESEN C, LI F, TOMASELLI KJ, DEBATIN KM, KRAMMER PH, PETER ME. Two CD5 (apo-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J* 1998; **17**: 1675–1687.
- [73] SCAFFIDI C, SCHMITZ I, ZHA J, KORSMEYER SJ, KRAMMER PH, PETER ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22532–22538.
- [74] SEGAL SM, BEEM E. Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity. *AJP-Cell Physiol* 2001; **281**: 1196–1204.
- [75] SHI Y. A structural view of mitochondrial-mediated apoptosis. *Nature Struct Biol* 2001; **8**: 394–401.
- [76] SIKORA E. Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki. *Post Biochem* 1996; **42**: 108–113.
- [77] SPRINGER J, AZBILL RD, NOTTINGHAM SA., KENNEDY SE. Calcineurin-mediated Bad dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2000; **20**: 7246–7251.
- [78] SRINIVASULA SM, SALEH A, HEDGE R, DATTA P, SHIZAKI E, CHAI J, ROBBINS PD, FERNANDES-ALNEMRI T, SHI Y, ALNEMRI ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; **409**: 112–116.
- [79] STENNICKE HR, SALVESEN GS. Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Bioch Bioph Acta* 2000; **1477**: 299–306
- [80] STOKA V, TURK B, SCHENDEL LS, KIM HT, CIRMAN T, SNIPAS JS, ELLERBY ML, BREDESEN D, FREEZE H, ABRAHAMSON M, BRÖMME D, KRAJEWSKI S, REED CJ, YIN MX, TURK V, SALVESEN SG. Lysosomal protease pathways to apoptosis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 3149–3157.
- [81] SULEJCZAK D. Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 527–568.
- [82] SUN C, CAI M, MAEDOWS RP, XU N, GUNASEKERA AH, HERRMANN J, WU JC, FESIC SW. NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* 2000; **275**: 33777–33781.
- [83] SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZANI N, MARZO I, SNOW BE, BROTHERS GM, MANGIN J, JACOTOT E, CONSTANTINI P, LOEFFLER M, LAROCLETTE N, GOODLET DR, AEBERSOLT R, SIDEROVSKI DP, PENNINGER JM, KROEMER G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**: 441–446.
- [84] TAKAHASHI R, DEVERAUX Q, TAMMI I, WELSH K, ASSA-MUNT N, SALVESEN GS, REED JC. A single BIR domain of XIAP is sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7787–7790.
- [85] TEWARI M, QUAN LT, O'ROURKE K, DESNOYERS S, ZENG Z, BEIDLER DR, POIRIER GG, SALVESEN GS, DIXIT VM. Yama/ CPP32 β , mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995; **81**: 801–809.
- [86] THORNBERRY AN, RANO AT, PETERSON PE, RASPER MD, TIMKEY T, GALCIA-CALVO M, HOUTZAGER MV, NORDSTROM AP, ROY S, VAILLANCOURT PJ, CHAPMAN TK, NICHOLSON WD. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17903–17911.
- [87] THORNBERRY AN, ROSEN A, NICHOLSON WD. Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol* 1997; **41**: 155–177.

- [88] TSUJIMOTO Y. Bcl-2 family: life or death switch. *FEBS Lett* 2000; **466**: 6–10.
- [89] VAN LOO G, VAN GURP M, DEPUYDT B, SRINIVASULA SM, RODRIGUES I, ALNEMRI ES, GEVAERT K, VANDEKERCKHOVE J, DECLERCQ W, VANDENABEELE P. The serine protease Omi/Htra2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 20–26.
- [90] VENTIMIGLIA R, LAU FL, KINLOCH AR, HOPKINS A, KARRAN HE, PETALIDIS PL, VARD VR. Role of caspases in neuronal apoptosis. *Drug Develop Res* 2001; **52**: 515–533.
- [91] VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSCH M, SILKE J, CONNOLLY LM, REID GE, MORITZ RL, SIMPSON RJ, VAUX DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein death promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; **102**: 43–53.
- [92] VUCIC D, KAISER WJ, MILLER L. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* protein HID and GRIM. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3300–3309.
- [93] WEHRLI P, VIARD I, BULLANI R, TSCHOPP J, FRENCH LE. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 141–148.
- [94] WIDŁAK P. Mechanizm fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 583–597.
- [95] WOJCIECHOWSKA M. Symptomy programowanej śmierci komórek podczas rozwoju roślin. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 317–333.
- [96] XU G, CIRILLI M, HUANG Y, RICH RL, MYSZKA DG, WU H. Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature* 2001; **410**: 494–497.
- [97] YANG Y, FONG S, JENSEN JP, WEISSMAN AM, ASHWELL JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000; **288**: 874–877.
- [98] YUAN JY, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell* 1993; **75**: 641–652.
- [99] ZHIVOTOVSKY B, SAMALI A, GAHM A, ORRENIUS S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 644–651.
- [100] ZOU H, LI Y, LIU X, WANG X. An APAF1 cytochrome c multimeric complex is functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11549–11556.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 01.07. 2002 R.

Przyjęto: 20.09.2002 R.

ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

CHARAKTERYSTYKA PŁYTKOWYCH RECEPTORÓW DLA ADP

CHARACTERISATION OF PLATELETS ADP RECEPTORS

Beata SKIBSKA*, Wiesława OKRÓJ*, Bogdan WALKOWIAK**

*Zakład Biofizyki Instytutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej

**Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie: Receptory płytkowe dla nukleotydu ADP odgrywają kluczową rolę w formowaniu skrzepeu i patogenezie naczyniowej. Receptory P2Y działają za pośrednictwem dwóch białek G, co pociąga za sobą aktywację wtórnych przekaźników wewnątrzkomórkowych. P2Y₁ zapoczątkowuje agregację przez mobilizację zasobów wapnia, podczas gdy niedawno zidentyfikowany receptor P2Y₁₂ hamując cyklazę adenylową jest niezbędny dla pełnej odpowiedzi agregacyjnej. Natomiast P2X₁ jest kanałem jonowym o dużej szybkości przekazu, którego udział w pobudzaniu płytek krwi nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Receptory płytkowe dla ADP są potencjalnymi celami leków przeciwzakrzepowych, takich jak tiklopidyna i klopidoogrel, a znajomość mechanizmu ich działania pozwala wyjaśnić rolę w zapobieganiu patologiom sercowo-naczyniowym.

Słowa kluczowe: ADP, płytki, purynoreceptory P₂, leki przeciwplateletowe.

Summary: Platelet ADP receptors play a crucial role in thrombosis and also in arteriosclerosis. The P2Y receptors are coupled to G proteins, and it results in activation of secondary intraplatelet signaling. The P2Y₁ receptor causes calcium ions release and this way initiates platelet aggregation, whereas recently identified receptor P2Y₁₂, by inhibition of adenyl cyclase, is necessary for full response. On the other hand, the P2X₁ receptor is a fast ionic channel, but its role in platelet activation still remains unclear. Platelet ADP receptors are potential targets for antiplatelet drugs. At present two antiplatelet agents acting on ADP receptors are available, i.e. ticlopidine and cripidogrel. Knowledge of the role of ADP receptors in platelet activation and aggregation processes makes possible prevention in arteriosclerosis.

Keywords: ADP, platelets, purinoreceptors P₂, antiplatelet drugs.

WSTĘP

Płytki krwi odgrywają kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi. Zaburzenie hemostazy w układzie krzepnięcia jest zwykle przyczyną patologicznych zmian przejawiających się powstawaniem zakrzepów i wynikających stąd zamknięć naczyń, co w efekcie prowadzi do martwicy nieukrwionej tkanki lub wylewów – określanych ogólnie jako skaza krwotoczna [46]. Sygnały aktywujące płytki krwi generowane są przez eksponowane na ich powierzchni specyficzne receptory, do których przyłączyły się cząsteczki agonistów lub białek adhezyjnych. Sygnały te przekazywane są do wnętrza płytek za pomocą białek G, białkowych kinaz serynowo-treoninowych i tyrozynowych, a także białek nadrodziny Ras [24]. Następuje wówczas charakterystyczna zmiana kształtu płytek z dyskooidalnego na kulisty, z wytworzeniem licznych wypustek ułatwiających kontakt z białkami adhezyjnymi i innymi płytkami krwi. Faza zmiany kształtu poprzedzona jest procesem szybkich zmian biochemicznych zachodzących we wnętrzu płytki krwi. Istota tych procesów polega na swoistym rozpoznawaniu cząsteczek i tworzeniu kompleksów oraz kontrolowanej fosforylacji i defosforylacji białek.

RECEPTORY PURYNERGICZNE

1. Charakterystyka ogólna i podział receptorów purynergicznych P1 i P2

Na podstawie badań farmakologicznych Burnstock [4] zasugerował w 1972 r. istnienie specyficznych receptorów błonowych dla ATP oraz produktu jego degradacji – adenozyne. Receptory te zostały nazwane receptorami purynergicznymi i podzielono je na dwie grupy: P1 i P2. Receptory P1 nazywane są adenozynowymi, gdyż ich naturalnym agonistą jest adenozyne. Na podstawie różnic strukturalnych i farmakologicznych wyróżnia się 4 podtypy receptorów P1: A1, A2A, A2B, A3. Każdy z nich związany jest z białkami G i ma 7 charakterystycznych domen transbłonowych [42]. Za pośrednictwem tych receptorów modulowana jest aktywność cykazy adenylowej i kinazy białkowej C, co skutkuje opróżnianiem wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych i wzrostem stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie.

Purnoreceptory typu P2 wiążą ATP, ADP oraz inne nukleotydy purynowe i pirymidynowe. Abbraccio i Burnstock [1] zaproponowali w 1994 r. podział receptorów P2 na dwa podstawowe typy:

P2X – obejmujący receptory o charakterze kanałów jonowych,

P2Y – receptory działające za pośrednictwem białek G.

Wraz ze wzrastającą ilością danych, uzyskanych dzięki klonowaniu genów kodujących białka receptorów P2, zwiększał się zasób informacji na temat ich budowy molekularnej i liczby podtypów. Dziś powszechnie używana jest klasyfikacja, w której receptory P2 zostały podzielone na 6 podtypów: P2X, P2Y, P2Z, P2T, P2U, P2D.

Głównym kryterium podziału były różnice farmakologiczne [42,16], m.in. powinowactwo receptorów do naturalnych i syntetycznych ligandów, jak również ich struktura i mechanizm działania.

Receptory P2Z tworzą duże kanały w błonie komórkowej mastocytów i niektórych komórek układu odpornościowego. Aktywacja tego receptora zachodzi pod wpływem milimolarnej ilości ATP i przejawia się ona gwałtownym wyrzutem endogennych nukleotydów i różnorodnych metabolitów wewnątrzkomórkowych oraz przepływem jonów przez błonę komórkową. Następuje napływ jonów Ca^{2+} z zewnątrz komórki i wzrost ich stężenia w cytoplazmie. Przedłużona aktywacja kanałów P2Z powoduje utratę istotnych metabolitów i w rezultacie śmierć komórki.

Receptory P2T występują w błonie komórkowej płytek krwi. Za ich pośrednictwem egzogeny ADP wywołują proces agregacji poprzedzony zmianą kształtu płytek, wzrostem stężenia jonów Ca^{2+} w ich wnętrzu i obniżoną aktywnością cykazy adenylowej.

Receptory P2U aktywowane są przez ATP i UTP (nukleotyd pirymidynowy), natomiast receptory P2D przez polifosforany diadenozyny – związki magazynowane i uwalniane w synapsach niektórych obszarów mózgu.

Największe zainteresowanie, ze względu na powszechność występowania, budzą jednak receptory z grupy P2X i P2Y.

2. Receptory P2X i P2Y – budowa i funkcje

a. Receptory P2X

Receptory P2X, nazywane receptorami jonotropowymi [26], są szybkimi kanałami jonowymi i umożliwiają wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie w ciągu milisekund. Charakteryzują się niską selektywnością dla kationów i działają nawet w warunkach hiperpolaryzacji błony komórkowej. Ulegają szybkiej desensytyzacji. Na podstawie analizy cDNA stwierdzono, że są to wielkocząsteczkowe, oligomeryczne białka, których podjednostki zbudowane są z 379 do 595 reszt aminokwasowych [30]. Podjednostki te składają się z dwóch transmembranowych domen połączonych dużą zewnątrzkomórkową pętlą. Oba końce łańcucha białkowego: aminowy i karboksylowy znajdują się po stronie cytoplazmatycznej. W części zewnątrzkomórkowej znajduje się 10 konserwatywnych ewolucyjnie reszt cysteiny i 14 reszt glicyny oraz od 2–6 potencjalnych miejsc glikozylacji. C-końce białka różnych typów receptorów P2X nie wykazują żadnej homologii w sekwencji aminokwasów, podczas gdy sekwencja aminokwasów fragmentu łańcucha białkowego pomiędzy N-końcem i końcem drugiej domeny hydrofobowej każdego z podtypów jest identyczna w 37–48% [7]. Wśród receptorów P2X udało się do tej pory scharakteryzować 7 ich rodzajów: P2X_1 – P2X_7 , [43]. Z porównania mas cząsteczkowych i właściwości farmakologicznych zrekombinowanych receptorów P2X_1 , P2X_2 i P2X_3 z innymi receptorami P2X wynika, że mogą one być heteromerycznymi kompleksami. Mogą składać się z przynajmniej trzech podjednostek lub wielokrotności tej liczby.

Mechanizm przekazywania sygnału z udziałem receptorów P2X jest ściśle związany z faktem, że są one kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów Na^+ , K^+ i Ca^{2+} . W mechanizmie tym brak jest wtórnych przekaźników, co powoduje, że czas przekazywania sygnału jest bardzo krótki (10–100 ms) [40]. Efektem stymulacji receptorów P2X jest depolaryzacja błony komórkowej, otwarcie zależnych od potencjału błonowego kanałów Ca^{2+} i wzrost stężenia tego jonu w komórce.

b. Receptory P2Y

P2Y stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną grupę receptorów. Jest ona sprzężona przez białko G z układem efektorowym – enzymem lub kanałem jonowym. Receptory P2Y nazwano receptorami metabotropowymi [10]. Czas przekazywania informacji przez te receptory jest znacznie dłuższy w porównaniu z czasami charakteryzującymi receptory P2X i trwa kilka sekund. Receptory P2Y są długimi, nierozgałęzionymi łańcuchami białkowymi zbudowanymi z 400–600 reszt aminokwasowych. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy, zawierający N-koniec po stronie zewnątrzkomórkowej, a C-koniec po stronie cytoplazmatycznej, siedmiokrotnie „przebija” podwójną warstwę lipidową błony komórkowej, tworząc w ten sposób siedem helikalnych domen transbłonowych rozdzielonych pętlami o naturze hydrofilowej [26].

Większość receptorów P2Y, sprzężonych z białkami G, jest glikoproteinami i zwykle zawiera od 1 do 9 potencjalnych miejsc N-glikozytacji. Prawie wszystkie receptory zawierają reszty cysteinowe w pierwszej i drugiej pętli zewnątrzkomórkowej, co pozwala na powstawanie mostków dwusiarczkowych stabilizujących aktywną strukturę receptora. Mutacje punktowe dotyczące tych reszt powodują zmianę funkcjonalnych właściwości receptorów. W trzeciej pętli cytoplazmatycznej znajdują się liczne miejsca fosforylacji dostępne dla kinazy białkowej C. Wiązanie ligandu do receptora odbywa się przez elektrostatyczne oddziaływanie między resztami fosforanowymi ATP i aminokwasami III, VI i VII domeny transmembranowej [49]. Do niedawna wyróżniano 11 podtypów receptorów P2Y₁–P2Y₁₁ [19]. Ostatnio stwierdzono istnienie kolejnego receptora P2Y₁₂ [21].

Droga przekazywania sygnału przez rodzinę wymienionych receptorów zapoczątkowana jest przyłączeniem agonisty do jego specyficznego miejsca wiążącego. Interakcja ta powoduje zmianę konformacji receptora, co pozwala na oddziaływanie z białkiem G po stronie wewnątrzkomórkowej i utworzenie potrójnego kompleksu agonista–receptor–białko G. Za pośrednictwem białka G uruchomiona zostaje fosfolipaza C (PLC) hydrolizująca fosfatydyloinozytolo(4,5)bifosforan (PIP_2) do diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo(1,4,5)trifosforanu (IP_3). DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), natomiast IP_3 , działając na specyficzne receptory umiejscowione w błonie siateczki śródplazmatycznej, opróżnia wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe, prowadząc do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Procesowi uwalniania jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych zasobów do cytoplazmy towarzyszy zwykle napływ tych jonów ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki [42].

Receptory P2Y sprzężone z białkami G kontrolują więc:

- aktywność cykazy adenylowej i syntezę cAMP,
- aktywność fosfolipazy C i syntezę dwóch wtórnych przekazników informacji: IP_3 i DAG,
- aktywność fosfolipazy A_2 i syntezę kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów (eikozanoidów),
- kanały jonowe (np. kanały Ca^{2+} i K^+) [42].

RECEPTORY PURYNERGICZNE W PŁYTKACH KRWI

W błonie komórkowej płytek krwi występują tylko niektóre spośród wyżej wymienionych typów receptorów purynergicznych. Charakterystycznymi receptorami płytkowymi są receptory z grupy P2, to jest receptory typu $P2X_1$, $P2Y_1$ oraz $P2Y_{12}$. Receptory te umożliwiają aktywację płytek z udziałem ADP.

Nukleotyd adenozynodwufosforanowy (ADP) odgrywa kluczową rolę w aktywacji i agregacji płytek. Jest on magazynowany w gęstych granulach płytek, obok ATP i serotoniny, i jest uwalniany podczas aktywacji płytki. ADP przez wiązanie do swoich receptorów na powierzchni płytek krwi moduluje system wtórnych przekazników, między innymi powoduje formowanie IP_3 [11] i mobilizację jonów Ca^{2+} [31].

Przez szereg lat ADP uznawano za znaczący mediator w hemostazie i tworzeniu skrzepu, natomiast natura płytkowych receptorów dla ADP pozostawała przedmiotem licznych dyskusji [25]. Wszystkie fizjologiczne i wewnątrzkomórkowe sygnały wyzwalane przez ADP w płytkach krwi przypisywano pojedynczemu, powierzchniowemu receptorowi. Na podstawie badań przyjęto, że jest to białko (100 kDa), które w wyniku modyfikacji przez inne związki, m.in. NBD-Cl wzmacnia odpowiedź płytkową indukowaną przez ADP. Ten domniemany receptor nazwano agreginą [39]. Nadal jednak molekularna natura tego receptora była nieznana, a pojedynczy płytkowy receptor dla ADP nazwano P2T [15]. Ostatnie lata wykazały istnienie więcej niż jednego podtypu receptora dla ADP na płytkach krwi.

1. Model dwóch typów receptorów płytkowych

Istnienie receptora $P2X_1$ na powierzchni płytki krwi wykazał McKenzie ze współpracownikami (w 1996 r.) stosując technikę *patch clamp* [34]. Kolejnym receptorem płytkowym, którego obecność została wykazana, był receptor $P2Y_1$ [32]. Przez dłuższy czas funkcjonował model dwóch receptorów płytkowych, zaproponowany przez Hourani'ego i Halla [22]. Model uwzględniał istnienie receptora $P2Y_1$ – wiążącego się z białkiem G oraz receptora $P2X_1$ – powodującego szybki napływ jonów wapnia do cytoplazmy z otoczenia płytki krwi.

2. Model trzech typów receptorów płytkowych

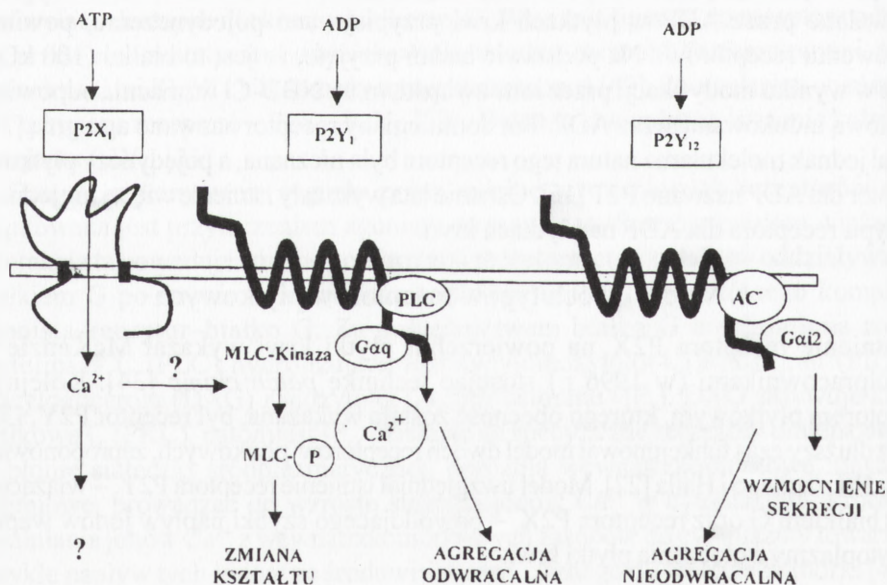
Obecnie postuluje się istnienie trzech typów receptorów. Pierwszy z nich, przez aktywację fosfolipazy C i formowanie IP_3 , przyczynia się do mobilizacji jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych zasobów i określany jest mianem $P2Y_1$. Drugi, określany jako $P2Y_{12}$, hamuje cyklazę adenylową i wzmacnia agregację płytkową zapoczątkowaną przez receptor $P2Y_1$. Trzeci receptor – $P2X_1$ ma właściwości jonotropowe i pozwala na szybki napływ jonów wapnia z otoczenia (ryc. 1).

3. Charakterystyka płytkowego receptora $P2X_1$

Płytkowy receptor $P2X_1$ jest białkiem zawierającym 399 aminokwasów (m. cz. 44 980), składającym się z dwóch transmembranowych domen, połączonych pętlą. Po stronie cytoplazmatycznej znajduje się koniec aminowy i karboksylowy łańcucha białkowego, a w części zewnątrzkomórkowej znajduje się 10 reszt cysteinowych [5].

Ekspresję genu $P2X_1$ stwierdzono w komórkach: pęcherza, trzustki, śledziony, prostaty, jelita cienkiego i grubego, jąder, jajników, wątroby płodowej oraz leukocytach krwi obwodowej i megakariocytach. Geny kodujące $P2X_1$ zlokalizowane są na chromosomie 17 [33]. Receptor $P2X_1$ ma sekwencję TMTTIGSG, która wykazuje wysokie podobieństwo do regionu tworzącego pory innych kanałów potasowych błony plazmatycznej [7]. Sekwencja ta nie występuje w pozostałych typach receptorów $P2X$.

Charakterystyczną cechą receptora $P2X_1$ jest szybka desensytyzacja, która powoduje, że bardzo trudno jest badać jego funkcje w aktywacji płytek *in vitro*. W celu uniknięcia desensytyzacji stosuje się wysokie stężenia apyrazy [14]. Do tej pory nie udało się



RYCINA 1. Schemat działania receptorów w agregacji płytek indukowanej przez ADP

ostatecznie zbadać wpływu tego receptora na hemostazę. Według koncepcji Kunapuli [31] $P2X_1$ nie odgrywa znaczącej roli w płytkowej agregacji indukowanej przez ADP. Oznaczałoby to, że szybki napływ jonów wapnia wywołany przez pobudzenie $P2X_1$ nie jest potrzebny do wywołania pobudzenia i zmiany kształtu płytek. Istnieją jednak dowody świadczące o tym, że receptor $P2X_1$ wywołuje zmianę kształtu płytek [41] na skutek istnienia jonów wapnia na zewnątrz płytki, które są absolutnie niezbędne do wywołania tego efektu spowodowanego przez α, β -MeATP.

Badania te pokazały, że aktywacja $P2X_1$ może bezpośrednio stymulować funkcjonalną odpowiedź płytek krwi bez udziału wtórnych przekaźników. Aktywacja $P2X_1$ może także wzmocnić działanie agonistów receptorów metabotropowych, ponieważ napływ jonów Ca^{2+} następuje szybciej niż uwalnianie ich z wewnątrzkomórkowych zasobów. Szybka mobilizacja jonów Ca^{2+} może przyspieszać aktywność fosfolipazy C i uwalnianie IP_3 . Aktywacja receptora $P2X_1$ podczas hemostazy zależy od ATP i diadenozynowych polifosforanów wydzielanych przez płytki i inne komórki. Antagonistą receptora $P2X_1$ jest MRS2179, natomiast farmakologiczny profil agonistów przedstawiano następująco: 2-metylotio-ATP > ATP > α, β Me-ATP > β, γ Me-ATP > ADP [14,50]. Do niedawna powszechnie uważano, że aktywacja receptora $P2X_1$ jest zależna także od ADP [18], choć w znacznie mniejszym stopniu. Oznaczało to, że nawet śladowe ilości nukleotydu trójfosforanowego powodowały aktywację receptora $P2X_1$, podczas gdy w przypadku nukleotydu dwufosforanowego niezbędne było zastosowanie bardzo wysokiego jego stężenia do wywołania odpowiedzi płytkowej. Na gruntowną zmianę poglądów wpłynęła obserwacja, że oczyszczony do homogenności nukleotyd ADP jest całkowicie nieaktywny w stosunku do receptora $P2X_1$ [35], a poprzednio prezentowane poglądy wynikały ze śladowego zanieczyszczenia komercyjnie dostępnego nukleotydu dwufosforanowego nukleotydem trójfosforanowym (1–2%).

4. Charakterystyka receptora $P2Y_1$

Nukleotyd ADP jest niezbędnym czynnikiem prowadzącym do zmiany kształtu płytki i w konsekwencji do agregacji za pośrednictwem receptora $P2Y_1$. Receptor $P2Y_1$ jest receptorem metabotropowym, odpowiedzialnym za uwalnianie zjonizowanego wapnia z wewnątrzkomórkowych zasobów, przez co inicjowane są procesy powodujące agregację [36].

Receptor $P2Y_1$ sklonowany został z komórek: HeLa, MEG-01, Dami, CHRF-288 i K562 oraz z ludzkich komórek śródbłonna [14,2]. Ludzki receptor $P2Y_1$ zawiera 373 aminokwasy z siedmioma regionami hydrofobowymi i jest kodowany przez pojedynczy ekson w genie zlokalizowanym na chromosomie 3q²⁴ [14]. Występuje w licznych tkankach, m.in. w sercu, naczyniach krwionośnych, komórkach mięśni gładkich oraz komórkach nerwowych, prostatie i jajnikach.

Zmiana kształtu płytki krwi jest wynikiem działania wielu mechanizmów, zapoczątkowanych wiązaniem receptora $P2Y_1$ z odpowiednią rodziną białek G. Pokazano, że zmiana kształtu może być regulowana przez dwie niezależne drogi transdukcji sygnału. Pierwsza z nich polega na stymulacji receptora $P2Y_1$ z udziałem białka Gq, co powoduje aktywację fosfolipazy C (PLC), która z kolei hydrolizuje

fosfatydyloinozytolo(4,5)bifosforan do trifosfoinozytoli (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG). IP_3 powoduje uwalnianie jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych zasobów i wzrost ich stężenia w cytoplazmie [30]. Druga droga, dotąd słabo poznana, związana jest z białkiem G_{12}/G_{13} oraz RHO (Rho-kinaza). Receptor $P2Y_1$ wiążąc się z białkiem G_{12}/G_{13} działa na RHO, co również prowadzi do zmiany kształtu płytek [12].

Zaangażowanie receptora $P2Y_1$ w inicjację zmiany kształtu i agregację płytek wywołaną przez ADP wykazano dzięki zastosowaniu antagonistów tego receptora. Stwierdzono, że A_2P_5P (adenozyno-2-fosforan-5-fosforanowy w stężeniu 1 mM) całkowicie hamuje zmianę kształtu i agregację indukowaną przez ADP [12]. Obserwacje w mikroskopie elektronowym płytek poddanych działaniu tego antagonisty wykazały typowy obraz dyskooidalnych, nienaruszonych płytek, z granulami sekrecyjnymi rozproszonymi w cytozolu. Badania te potwierdziły, że receptor $P2Y_1$ jest niezbędny do prawidłowo przebiegającej zmiany kształtu płytek i agregacji wywołanej przez ADP.

Selektywnymi antagonistami receptora $P2Y_1$ są: $A3P5P$, $A3P5PS$, $MRS2179$, $MRS2279$. Ponadto kompetycyjnymi antagonistami są: ATP , $ATP\alpha S$, $2-MeSATP$ oraz $2-CIATP$ [31]. Obecnie farmakologiczny profil agonistów opisywanego receptora przedstawia się następująco: $2MeSADP \gg ADP = ADP\alpha S > ADP\beta S$ [14]. Znacząco to, że związek $2MeSADP$ jest najsilniejszym agonistą receptora $P2Y_1$, a nukleotyd ADP działa znacznie słabiej. Jest więc ogólnie uznawany za słabego agonistę płytkowego. Jednak wykazano, że jest niezbędny do normalnej aktywacji płytek zapoczątkowanej przez innych silniejszych agonistów, takich jak: trombina lub kolagen, które indukują sekrecję ADP z gęstych granul.

Receptor $P2Y_1$, wiążąc ADP , pośredniczy w zmianie kształtu płytek, aktywując fosfolipazę C i uwalniając jony wapnia z wewnątrzkomórkowych zapasów. Prowadzi to do odwracalnej agregacji. Obecność receptora $P2Y_1$ jest jednak niewystarczająca dla całkowitej płytkowej odpowiedzi. Pełna agregacja jest skutkiem działania dwóch receptorów: $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ [51].

5. Charakterystyka receptora $P2Y_{12}$

Wzmocnienie agregacji płytkowej, zapoczątkowanej przez wiązanie receptora $P2Y_1$, może nastąpić przy udziale kolejnego – trzeciego receptora płytkowego, nazwanego receptorem $P2Y_{12}$ [28].

Przez długi czas prowadzono badania nad budową i funkcją tego receptora. Przepuszczano, że wykazuje on cechy zarówno receptorów z grupy $P2X$ – jonotropowych, jak i $P2Y$ – metabotropowych. Dlatego nazewnictwo jego było bardzo różnorodne: $P2Y_T$, $P2T_{AC}$, $P2T_{ADP}$, $P2T$, $P2Y_{CYC}$ [12,47]. Dopiero, kiedy w styczniu 2001 roku został on sklonowany przez Hollopetera i innych [21], ostatecznie nazwano go $P2Y_{12}$ i zaliczono do grupy receptorów metabotropowych, wiążących się z białkami G.

Receptor $P2Y_{12}$ zlokalizowany jest w genie na chromosomie $3q^{24-25}$ [14]. Na tym samym chromosomie kodowane są: receptor $P2Y_1$ i receptor dla UDP-glukozy. Okazuje się, że receptor $P2Y_{12}$ jest w 19% identyczny z receptorem $P2Y_1$, a w 44% identyczny z receptorem UDP-glukozy. Tkankowa dystrybucja opisywanego receptora ogranicza się do płytek, niektórych obszarów mózgu i rdzenia kręgowego. Mechanizm działania

polega na hamowaniu cykazy adenylowej przez wiązanie się z białkiem G_p , co prowadzi do obniżenia stężenia cAMP oraz wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} we wnętrzu komórki. Nie wpływa to bezpośrednio na zmianę kształtu płytek, lecz na samą agregację, wzmacniając działanie receptora $P2Y_1$. Jeżeli jednocześnie następuje aktywacja przez ADP receptorów $P2Y_1$ i $P2Y_{12}$, to dochodzi do całkowitej odpowiedzi agregacyjnej. Natomiast gdy receptor $P2Y_{12}$ jest blokowany przez selektywny inhibitor, funkcja jego może być przywrócona przez aktywację innego receptora wiążącego białko G_i (α_2 -adrenergicznego)[23].

Charakterystyczną cechą receptora $P2Y_{12}$ jest fakt, że ADP jest jego naturalnym agonistą, a ATP – współzawodniczącym antagonistą [14].

Farmakologiczny profil agonistów przedstawia się następująco: $2\text{ MeSADP} \gg \text{ADP} = \text{ADP}\beta\text{S}$ [14]. Porównując moc działania nukleotydu ADP jako agonisty wykazano, że ADP jest silniejszym agonistą dla receptora $P2Y_1$ ($EC_{50} \sim 0,3 \mu\text{M}$) niż dla receptora $P2Y_{12}$ ($EC_{50} \sim 2 \mu\text{M}$). Specyficznymi inhibitorami receptora $P2Y_{12}$ są leki przeciw-płytkowe – tiklopidyna i kłopidogrel [31] i ostatnio badany związek o bardzo wysokiej potencji oznaczony symbolem CS-747 [48].

Natomiast antagonistami są: $\text{ATP}\alpha\text{S}$ (adenozyno-5'-o-1tiotrifosforan), 2MeSATP (2-Metylotioadenozyno-5'-trifosforan), 2CIATP (2-Chloroadenozyno-5'-trifosforan) oraz AR-C66096MX (2-Propyltio- β,γ -difluorometyleno adenozynotrifosforan), AR-C67085MX (2-Propyltio- β,γ -dichlorometyleno adenozynotrifosforan) i AR-C69931MX (N^6 -(2-Metyltioetyl)-2-(3,3,3-trifluoropropyltio)- β,γ -dichlorometyleno adenozynotrifosforan) [14].

Selektywna inhibicja receptora $P2Y_{12}$ w aktywacji poprzez ADP przy udziale tych antagonistów wykazuje redukcję i szybko odwracalną agregację z niezauważalnym efektem zmiany kształtu. Dzięki zastosowaniu agonistów i antagonistów receptora $P2Y_{12}$ można było wyjaśnić szerokie spektrum działania tego receptora. Wykryto między innymi, że receptor $P2Y_{12}$ jest zaangażowany w tworzeniu stabilnych makroagregatów przez pełną aktywację integryn $\alpha\text{IIb}\beta_3$ [39]. Wzmacnia on również procesy reorganizacji cytoszkieletu, polepszając polimeryzację aktyny i cytoszkieletową translokację małych GTPaz.

Receptor $P2Y_{12}$ jest nadal obiektem licznych badań i doświadczeń. Ostatnie doniesienia dotyczyły sklonowania receptora przypominającego płytkowy receptor ADP, który nazwano SP1999; chociaż receptor ten nie odpowiadał ściśle sekwencji rodziny receptorów P2 dla zewnątrzkomórkowych nukleotydu, to jego profil farmakologiczny przypominał profil receptora $P2Y_{12}$: $2\text{-MeSADP} \rightarrow \text{ADP} = \text{ADP}\beta\text{S} \gg \text{ATP}\gamma\text{S} \gg 2\text{CIATP} \gg \alpha\beta\text{MeATP}$ [40]. W rezultacie uznano, że sklonowany receptor SP1999 to w rzeczywistości $P2Y_{12}$. Identyfikacja tak ważnego receptora pozwoliła na lepszą charakterystykę czynników antypłytkowych w przypadku chorób sercowo-naczyniowych.

LEKI PRZECIWPŁYTKOWE

Opisane receptory płytkowe dla nukleotydu ADP odgrywają kluczową rolę w formowaniu skrzepu oraz w patogenezie naczyniowej. Znajomość ich funkcji pozwala wyjaśnić wpływ leków stosowanych w celu zapobiegania powikłaniom naczyniowym u chorych z przebyłym zawałem mięśnia sercowego, udarem mózgu lub chorobą tętnic obwodowych [6].

1. Aspiryna

Najbardziej rozpowszechnionym lekiem przeciwplatekcyjnym był do tej pory kwas acetylosalicylowy (aspiryna) [37], który stosowano w profilaktyce oraz w celu zmniejszaniu powikłań niedokrwienych (zawał bez załamka Q) związanych między innymi z angioplastyką [17]. Aspiryna hamuje syntezę prostacyklin i tromboksanu A_2 oraz innych aktywatorów płytek [45]. Z uwagi na rozległe działania niepożądane (indukowanie astmy, stany zapalne dolnego odcinka przewodu pokarmowego, zaparcia, biegunki, nudności, zawroty głowy, pokrzywka) stosuje się ją coraz rzadziej. Obecnie aspirynę stosuje się również w leczeniu skojarzonym z innymi lekami przeciwplatekcyjnymi, np. z tiklopidyną (m.in. do prewencji podostrych zakrzepów po założeniu stentu).

2. Tiklopidyna

Tiklopidyna 5-(o-Chlorobenzyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-pyridyna jest pochodną tienopirydyny i podana *in vivo* przedłuża czas krwawienia. Jest ona pierwszym obok kłopidogrelu inhibitorem receptora $P2Y_{12}$ użytym klinicznie jako lek antyplatekcyjny [8,29]. Nie modyfikując zmiany kształtu płytek i przemieszczeń jonów wapnia uniemożliwia agregację płytek krwi.

Tiklopidyna znalazła zastosowanie w zapobieganiu powikłaniom zakrzepowatości w mózgu i sercu oraz poważnym incydentom niedokrwienym u chorych z przewlekłym procesem zarostowo-zakrzepowym w tętnicach kończyn dolnych w fazie chromania przestankowego. Jest również stosowana profilaktycznie i leczniczo w zaburzeniach platekcyjnych spowodowanych stosowaniem krążenia pozaustrojowego w chirurgii oraz podczas hemodializy.

3. Kłopidogrel

Kłopidogrel – inna pochodna tienopirydynowa – ma działanie podobne do tiklopidyny. Jest ona mniej znanym lekiem i praktycznie słabo wykorzystywanym w krajowej medycynie. W porównaniu z tiklopidyną charakteryzuje się wyższą potencją działania. Jest estrem metylowym kwasu (S)- α -(2-chlorofenyl)-6,7-dihydro-2H-pyridyno-5(4H)-octowego [38] i w tej formie nie przejawia aktywności platekcyjnej. Ulega aktywacji w wątrobie, a następnie zostaje przekształcany do nieczynnego metabolitu (SR 26334) [9,3,20] i jest eliminowany głównie przez nerki.

Potwierdzenia wymaga informacja, że lek ten mógłby hamować indukowaną przez płytki ekspresję czynnika tkankowego w śródbłonku [44].

V. PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat receptorów dla ADP na płytkach krwi. Opisano budowę i funkcję trzech receptorów płytkowych: P2X₁, P2Y₁, P2Y₁₂, biorących udział w procesach aktywacji, zmiany kształtu i agregacji płytek krwi.

Przekazano również podstawowe informacje o lekach przeciwplatekowych stosowanych powszechnie w terapii. W wyniku ich zastosowania obserwuje się zahamowanie agregacji płytek krwi i wydłużenie czasu krwawienia. Dzięki tym właściwościom zmniejsza się ryzyko chorób sercowo-naczyniowych.

LITERATURA

- [1] ABBRACHIO MP, BURNSTOCK G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; **64**: 445–475.
- [2] AYYANATHAN K, WEBB TE, SANDHU AK. Cloning and chromosomal localization of human P2Y₁ purinoceptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 783–788.
- [3] BERGER Y, HERBERT JM. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 1994; **72**: 313–317.
- [4] BERNARD EA, BURNSTOCK G, WEBB TE. G-protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 1994; **15**: 67–70.
- [5] BING SUN JLI, OKAHARA K, JUN-ICHI KAMBAYASHI. P2X₁ purinoceptor in human platelets. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11544–11547.
- [6] BRASS S. Small cells, big issues. *Nature* 2001; **409**: 145–147.
- [7] BUELL G, COLLOG M, RUSSENDREN F. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci* 1996; **8**: 2221–2228.
- [8] CAZENAVE JP, GACHET CH. Anti-platelet drugs: do they effect megakaryocytes? *Bailliere's Clinical Haematol* 1997; **10**: 163–180.
- [9] COUKELL AJ, MARKHAM A. Clopidogrel. *Drugs* 1997; **54**: 745–775.
- [10] DANIEL JL, DANGELMAIER C, JIN J. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2024–2029.
- [11] DANIEL JL, DANGELMAIER CA, SELAK M. ADP stimulates IP₃ formation in human platelets. *FEBS Lett* 1986; **206**: 299–303.
- [12] ECKLY A, GENDRAULT JL, HECHLER B, CAZENAVE JP, GACHET CH. Differential involvement the P2Y₁ and P2YT receptors in the morphological changes of platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 694–701.
- [13] FOSTER CJ, PROSSER DM, AGANS JM. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1591–1598.
- [14] GACHET CH. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 222–232.
- [15] GACHET CH, HECHLER B, LEON C, LERAY C, OHLMAN PH, CAZENAVE JP. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 271–275.
- [16] GACHET G, HECHLER B, LEON C, VIAL C, OHLMANN P, CAZENAVE JP. Purinergic receptors on blood platelets. *Platelets* 1996; **7**: 261–267.
- [17] GOEN EA. Leczenie przeciwzakrzepowe pacjentów poddawanych zabiegom rewaskularyzacji przez cewnik. [w:] Ginsberg J, Kearon C, Hirsh J [red.] Zakrzepica tętnicza i zaburzenia hemostazy – rozstrzygające decyzje kliniczne. Bielsko Biala. α-medica press 1998: 51–53.

- [18] GRECO NJ, TONON G, CHEN W. Novel structurally altered P2X₁ receptor is preferentially activated by ADP in platelets and megakaryocytic cells. *Blood* 2001; **98**: 100–107.
- [19] HECHLER B, LEON C, VIAL C, VIGNE P, FREULIN CH, CAZENAVE JP, GACHET CH. The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-Diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 1998; **92**: 152–159.
- [20] HERKER LA, ULLE MD, MARZEC M, KELLY AB. Clopidogrel inhibition of stent, graft and vascular thrombogenesis with antithrombotic enhancement by aspirin in nonhuman primates. *Circulation* 1998; **98**: 2461–2469.
- [21] HOLLOPETER G. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; **409**: 202–207.
- [22] HOURANI SMO, HALL DA. Receptors for ADP on human platelets. *Trends Pharmacol Sci* 1994; **15**: 103–108.
- [23] HOYLAERTS MF, OURY C, TOTH-ZSAMBOKI E, VERMYLEN J. ADP receptors in platelets activation and aggregation. *Platelets* 2000; **11**: 307–309.
- [24] JANIĄK A, CIERNIEWSKI CS. Wczesne fazy aktywacji płytek. *Acta Hematol Polon* 1997; **28** supl 2: 15–29.
- [25] JARVIS CE. ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y₁ and P2T receptors. *Br J Pharmacol* 2000; **129**: 275–282.
- [26] JASINOWSKI M, GRZONKA Z, ŁANKIEWICZ L. Receptory sprzężone z białkami G (GPCR), metody badań oddziaływań ligand-receptor. *Post Bioch* 2000; **46**: 60–72.
- [27] JIN J, QUINTON TM, ZHANG J, KUNAPULI SP. ADP-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin αIIbβ₃ and ADP receptors. *Blood* 2002; **99**: 193–198.
- [28] JIN J, TOMLINSON W, KIRK IP, KUNAPULI SP. The C6-2B glioma cell P2Y_{AC} receptor is pharmacologically and molecularly identical to the platelet P2Y₁₂ receptor. *Brit J Pharm* 2001; **133**: 521–528.
- [29] JOSEPH JE, MACHIN SJ. New antiplatelet drugs. *Blood Rev* 1997; **11**: 178–190.
- [30] KUKULSKI F, KOMOSZYŃSKI M. Sygnałowa funkcja ATP w centralnym układzie nerwowym. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 33–50.
- [31] KUNAPULI SP. Functional characterization of platelet ADP receptors. *Platelets* 1998; **9**: 343–351.
- [32] LEON C, VIAL C, GACHET CH, OHLMANN P, HECHLER B, CAZENAVE JP, LECCHI A, CATTAN-CEO M. The P2Y₁ receptor is normal in a patient presenting a severe deficiency of ADP-induced platelet aggregation: further evidence for a distinct P2 receptor responsible for adenylyl cyclase inhibition. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 775–781.
- [33] LONGHURST PA, SCHWEGEL T, FOLANDER K, SWANSON R. The human P2X₁ receptor: molecular cloning, tissue distribution and localization to chromosome 17. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1308**: 185–188.
- [34] MAC KENZIE AB, MAHAUT-SMITH MP, SAGE SO. Activation of receptor – operated cation channels via P2X₁ not P2T purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2879–2881.
- [35] MAHAUT-SMITH PM, ENNION SJ, ROLF MG, EVANS RJ. ADP is not an agonist at P2X₁ receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br J Pharm* 2000; **131**: 108–114.
- [36] OHLMAN PH, ECKLY A, FREUND M, CAZENAVE JP, OFFERMANN S, GACHET CH. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen -induced aggregation in the absence of G_{αq}. *Blood* 2000; **96**: 2134–2139.
- TRAILTRAILTRAILTRAIL[37] PODLEWSKI JK, CHWALIBOGOWSKA-PODLEWSKA A. Leki współczesnej terapii. Warszawa: Wydawnictwo Fundacji Büchnera 1996: 842–843.
- [38] PODLEWSKI JK, CHWALIBOGOWSKA-PODLEWSKA A. Leki współczesnej terapii. Warszawa: Wydawnictwo Fundacji Büchnera 2001/2002: 159–160.
- [39] PURI RN, COLMAN RW. Inhibition of ADP- induced platelet aggregation by 7-chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole covalent modification of aggregin, a putative receptor ADP. *J Cell Biochem* 1996; **61**: 97–108.
- [40] RELAVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Am J Pharmacol Exp Ther* 1998; **50**: 413–492.
- [41] ROLF MG, BREARLEY CHA, MAHAUT-SMITH MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X₁ purinoceptors with a,b-Methylene ATP. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 303–308.

- [42] SABAŁA P. Receptory purynergiczne. [w] Nowak JZ, Zawilska JB [red.] Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja. Warszawa: PWN 1997: 211–223.
- [43] SATYA, KUNAPULI P, DANIEL JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 1998; **336**: 513–523.
- [44] SAVI P, COMBALBERT J, GAICH G, ROUCHON MC, MAFFRAND JP, BERGER Y, HERBERT JM. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 1994; **72**: 313–317.
- [45] SCHRÖR K. Antiplatelet Drugs. *Drugs* 1995; **50**: 7–28.
- [46] STOREY RF, HEPTINSTALL S. Laboratory investigation of platelet function. *Clin Lab Haematol* 1999; **21**: 317–329.
- [47] STOREY RF, SANDERSON HM, WHITE AE, MAY JA, CAMERON KE, HEPTINSTALL S. The central role of the P2T receptor in amplification of human platelet activation, aggregation secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol* 2000; **110**: 925–934.
- [48] SUGIDACHI A, FUMITOSHI A, OGAWA T, INOUE T, KOIKE H. The *in vivo* pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties. *Br J Pharm* 2000; **129**: 1439–1446.
- [49] VAN RHEE AM, FISHER B, VAN GALEN PJM, JACOBSON KA. Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template. *Drug Des Discov* 1995; **13**: 133–154.
- [50] VIOL C, HECHLER B, LEON C, CAZENAVE JP, GACHET C. Presence of P2X₁ purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 1500–1504.
- [51] WOULFE D, YANG J, BRASS L. ADP and platelets, the end of the beginning. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1503–1505.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 05.07. 2002 r.

Przyjęto: 18.09.2002 r.

ul. Stefanowskiego 1 90-924 Łódź

bogdan.walkowiak@csk.am.lodz.pl

DNA I BIAŁKA CENTROMEROWE

CENTROMERIC DNA AND PROTEINS

Maria Joanna OLSZEWSKA

Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Wspólną cechą dotąd zbadanych DNA centromerowych jest obecność układów tandemowych, przy czym wchodzące w ich skład monomery w poszczególnych chromosomach tego samego gatunku mogą różnić się strukturą 1-rzędową. Pewne ogólne podobieństwo sekwencji centromerowego DNA stwierdza się w rzędzie naczelnych, a także u spokrewnionych gatunków roślin wyższych. U traw głównym składnikiem DNA centromerowego są retroelementy z rodzin *gypsy* i *copia*, które u roślin dwuliściennych bywają obecne w nieznaczących ilościach. Rozmaitość sekwencji DNA centromerowego, a także obecność w funkcjonalnych neocentromerach odmiennych sekwencji DNA niż w normalnych centromerach tego samego gatunku budzi wątpliwości co do istoty znaczenia DNA w pełnieniu przez centromery ich roli, tj. generowania kinetochorów. Porównanie białek – CENP – obecnych w normalnych centromerach, neocentromerach oraz w aktywnych i nieaktywnych centromerach chromosomów dicentrycznych wskazuje, że wśród poznanych dotąd białek konstytutywnych niezbędne dla funkcjonowania centromerów są CENP-A i CENP-C, zaś wśród CENP fakultatywnych – CENP-E i CENP-F.

Słowa kluczowe: centromerowy DNA, centromerowe białka, rośliny wyższe, ssaki.

Summary: The common feature of the centromeric DNA studied till now is the presence of long tandem arrays in which the monomers may slightly differ in their nucleotide sequences. Some general similarities have been found among Primates, as well as among related higher plant species. In grasses the retroelements from *gypsy* and *copia* families, whose little amount may be present in dicotyledonous species, constitute the main components of centromeric DNA. The variety of DNA centromeric sequences and the presence in active neocentromeres of DNA sequences different from those in normal centromeres in the same species bring some doubts about the essential significance of DNA in centromere function, i.e. kinetochore formation. The results of comparative studies on the presence of centromeric proteins (CENPs) in normal centromeres, neocentromeres, active and non-active centromeres in dicentric chromosomes indicate that among constitutive proteins CENP-A and CENP-C and among facultative ones CENP-E and CENP-F are indispensable for centromere function.

Key words: centromeric DNA, centromeric proteins, higher plants, mammals.

1. WSTĘP

Centromer jest kompleksem nukleoproteinowym znajdującym się w wyspecjalizowanym regionie chromosomu, zwanym przewężeniem pierwotnym. Funkcja centromeru polega na prawidłowym rozdzieleniu chromosomów podczas mitozy i mejozy. Centromer jest strukturalnym podłożem dla kinetochoru, a także dla niektórych białek kohezyjnych (por. 4 i 5). Zakłócenia w wiernym przekazywaniu genów zlokalizowanych w siostrzanych chromatydach (mitoza i II podział mejozy) i rozdzielanie zrekombinowanych chromosomów homologicznych (I podział mejozy) powodują wiele zaburzeń rozwojowych i mogą prowadzić do skutków letalnych.

Poznanie struktury molekularnej centromerów warunkującej ich prawidłowe funkcjonowanie ma podstawowe znaczenie przy konstruowaniu sztucznych chromosomów (ang. *artificial chromosomes*), które bywają stosowane jako wektory w inżynierii genetycznej. Wielkie nadzieje w terapii genowej u człowieka wiążą się z konstruowaniem sztucznych chromosomów – HAC (*Human Artificial Chromosome*) jako nośników prawidłowych genów [29].

W analizie struktury molekularnej centromerów najpierw zwrócono uwagę na DNA, który jest obecny w centromerach wyższych *Eukaryota* w ilości rzędu co najmniej kilkuset kpz (ref. [16]). Dotychczasowe wyniki badań upoważniają do jedyne wniosku ogólnego: u wszystkich dotąd zbadanych gatunków DNA centromer jest zbudowany z ułożonych w szyku tandemowym różnej długości monomerów, których struktura I-rzędowa jest różnaita u poszczególnych organizmów (por. niżej oraz 3.1 i 3.2). Natomiast, jak się obecnie wydaje, powszechnie występującymi składnikami decydującymi o prawidłowym funkcjonowaniu centromerów są ich białka, zwane białkami centromerowymi (por. 4).

Najwcześniej rozpoznano DNA centromerowy u najniższych *Eukaryota* – drożdży oraz u człowieka. Informacje na ten temat można znaleźć w podręcznikach i monografiach (np. [37]), wobec czego tutaj zostaną ograniczone do krótkiego przypomnienia, natomiast DNA centromerowemu u roślin poświęcona jest osobna część artykułu.

U drożdży pączkujących, *Saccharomyces cerevisiae*, obszar w chromosomach zawierający odcinek DNA o długości 125 pz spełnia funkcję centromeru i kinetochoru, tj. stanowi miejsce przyczepu włókien wrzeciona podziałowego i przylegania siostrzanych chromatyd. Jednak sekwencja ta nie może być uznana za specyficzną dla centromerów, ponieważ ich struktura u innych organizmów okazała się bardziej skomplikowana. U drożdży rozszczepkowych, *Schizosaccharomyces pombe*, region centromerowy obejmuje 50–150 kpz. Składa się on z DNA centralnego rdzenia o długości 4–7 kpz, zawierającego sekwencje o niskiej liczbie kopii, otoczonego przez kompleks tandemowych powtórzeń zorganizowanych w długi palindrom (ref. [42]). U innego gatunku drożdży, *Kluyveromyces lactis*, DNA centromerowy jest podobny do *Schizosaccharomyces pombe*, składa się bowiem z 3 lub 4 konserwatywnych sekwencji DNA o długości 44–100 kpz z centralnym rdzeniem o rozmiarach 4–7 kpz (ref. [21]).

U wyższych *Eukaryota* (ssaki, rośliny wyższe) mających większe chromosomy, wprowadzenie metody FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) znacznie ułatwiło identyfikację tych frakcji DNA, które są specyficzne dla centromerów. Pewną trudność w badaniach wyłącznie molekularnych stanowiło odróżnienie DNA samego centromeru od przylegającej do niego z obu stron heterochromatyny przycentromerowej. Zastosowanie podwójnej metody FISH pozwoliło na precyzyjne ustalenie sekwencji DNA centromerowych różniących się od DNA wchodzącego w skład heterochromatyny przycentromerowej obecnością frakcji DNA o odmiennym składzie nukleotydowym.

U człowieka stwierdzono obecność co najmniej kilku typów satelitarnych DNA (ref. [37]), wśród których najlepiej poznany jest α -satelitarny DNA. U człowieka i innych Naczelnych α -satelitarny DNA jest zlokalizowany głównie w centromerach. U Naczelnych z Nowego i Starego Świata sekwencje α -satelitarne wykazują tylko 64% homologii sekwencyjnej (ref. [21]). Układy α -satelitarne wykazują znaczną heterogenność struktury I-rzędowej i długości powtarzalnych odcinków. U człowieka zsekwencjonowano ok. 300 kopii alfoidalnego (α -satelitarnego) DNA. Centromery każdego chromosomu zawierają tandemowe układy monomerów długości 170 pz. Poszczególne chromosomy zawierają zarówno warianty tych sekwencji, jak i charakterystyczne multimery wariantowych motywów, tworząc w ten sposób wzór chromosomowo-specyficzny (ref. [17]). Te właściwości zostały wykorzystane w cytogenetyce molekularnej człowieka m.in. do identyfikacji metodą FISH uszkodzonych chromosomów przy wykorzystaniu sond specyficznych dla DNA centromerów poszczególnych chromosomów. Dla wiązania specyficznych białek centromerowych, a tym samym pełnej sprawności funkcjonalnej centromerów wystarczą nawet nieznaczące ilości α -satelitarnego DNA [6]. U innych ssaków, na przykład u jelenia muntjak, centromery zawierają tandemowy (satelitarny) DNA zbudowany z powtarzających się monomerów długości 972 pz; jest on zlokalizowany, jak wykazano metodą FISH, wyłącznie w centromerach wszystkich chromosomów. Sekwencja 972 pz wykazuje pełną homologię do sekwencji centromerowych innych gatunków jeleni, ale jest całkowicie odmienna pod względem struktury I-rzędowej od ludzkiego – satelitarnego DNA [54]. Z kolei u myszy (*Mus musculus*) tzw. *minor satellite* DNA znajduje się w centromerach wszystkich chromosomów. Jest on również zbudowany z tandemowych powtórzeń, ale o średniej długości 300 pz, przedzielonych niekiedy innymi sekwencjami (ref. [2]). Podobnie jak u człowieka stwierdzono chromosomowo-specyficzne warianty tych sekwencji (ref. [17]).

2. NEOCENTROMERY I NIEAKTYWNE CENTROMERY

Bardzo istotne dane umożliwiające zidentyfikowanie tych składników centromerów, które są niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania, zostały uzyskane z badań porównawczych normalnych centromerów z neocentromerami i nieaktywnymi centromerami chromosomów dicentrycznych. Badania takie były przeprowadzane głównie na materiale zwierzęcym. **Neocentromer** jest funkcjonalną strukturą powstałą

spontanicznie lub utworzoną sztucznie w nowym regionie chromosomu, pozbawionym uprzednio centromeru. Neocentromer jest w pełni funkcjonalny, jak wykazały wyniki licznych badań przeprowadzonych zarówno na materiale roślinnym, jak i zwierzęcym. **Nieaktywne centromery** są przekształceniem normalnych, aktywnych. Powstają one w wyniku translokacji polegających na połączeniu dwóch ramion różnych chromosomów, z których każde zawiera własny centromer, w rezultacie czego powstaje chromosom dicentryczny. Taki chromosom może być stabilny, ponieważ tylko jeden centromer jest aktywny, tj. tylko na jednym centromerze powstaje kinetochor.

U roślin neocentromery tworzą się zwykle w regionach chromosomów bogatych w heterochromatynę. U kukurydzy w tzw. niezwykle długim chromosomie 10, oznaczanym jako Ab10, neocentromery zawierają długie, tandemowe powtórzenia monomerów zawierających 180 pz, między którymi występują retroelementy (ref. [42]). Wykazują one jednak bardzo słabe sygnały hybrydyzacyjne w metodzie FISH z sekwencją charakterystyczną dla normalnych centromerów u zbóż – CCS1, natomiast stwierdzono brak hybrydyzacji z sekwencją specyficzną dla centromerów kukurydzy – MCS1 (por. 3.2) [2]. Sekwencje te są zatem odmienne od normalnych sekwencji centromerowych. Neocentromery powstające w warunkach kultur *in vitro* komórek człowieka nie zawierają α -satelitarnego DNA. W ich centralnej części znajduje się domena z DNA długości 80 kpz [6]. Z danych tych wynika, że tworzenie neocentromerów i ich funkcjonowanie nie zależy od obecnych w nich sekwencji centromerowych DNA właściwych dla gatunku. Sztuczny minichromosom u ssaków, w którym brak jest ludzkiego alfoidalnego DNA oraz mysich powtórzeń satelitarnych charakterystycznych dla DNA centromerowego, replikuje się i ulega segregacji ze znaczną wiernością po przeniesieniu do komórek kurczenia dzięki obecności neocentromerów [48]. Neocentromery zawierają wszystkie białka centromerowe zarówno konstytutywne, jak i fakultatywne z wyjątkiem CENP-B [por. 4]. Funkcjonowanie neocentromerów może być regulowane przez mechanizmy epigenetyczne dzięki szczególnej strukturze drugorzędowej DNA, uwarunkowanej obecnością sekwencji tandemowych [24]. Analogiczna sugestia została wysunięta na podstawie wyników badań neocentromerów chromosomu Ab10 u kukurydzy [19].

Nieaktywne centromery oczywiście zawierają DNA charakterystyczne dla centromerów danego gatunku. Natomiast mimo obecności w nich satelitarnego DNA w przypadku nieaktywnych centromerów człowieka brak jest w nich bądź wszystkich białek centromerowych, bądź są w nich tylko CENP-B, -G i -H (por. 4) [13].

3. DNA CENTROMEROWY U ROŚLIN WYŻSZYCH

Badania molekularne DNA centromerowego u roślin wyższych zostały zapoczątkowane w latach 80. na modelowej roślinie dwuliściennej – *Arabidopsis thaliana* – rzodkiewnik (ref. [32]), zaś u jednoliściennych – w latach 90. z wykorzystaniem DNA trawy *Brachypodium sylvaticum* [2]. Dobór obu gatunków nie był przypadkowy. Charakteryzują się one małym genomem, wobec czego udział w nim sekwencji

powtarzalnych jest stosunkowo niski (ref. [40]), co ułatwia prze-szukiwanie bibliotek genomowych, głównie BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) i identyfikację frakcji sekwencji tandemowych przez tzw. wzór drabinkowy w hybrydyzacji typu Southern. U *Arabidopsis thaliana* ($2n = 10$, $2C$ DNA = 0,4 pg) sekwencje powtarzalne stanowią zaledwie 25% genomu (ref. [60]). U tej rośliny sklonowano w 1986 r. sekwencję tandemową pAL1 o długości monomerów 180 pz (Martinez-Zapater i wsp., ref. [18]). Całkowita liczba kopii tej sekwencji wynosi ok. 5×10^3 , co stanowi 1–1,5% genomu (ref. [18]). Z kolei reprezentatywna sekwencja centromerowa dla roślin zbożowych – CCS1 – została sklonowana z dziko rosnącej trawy *Brachypodium sylvaticum* [2], ($2n = 18$, $2C$ rzędu 0,44–0,54 pg – w zależności od metody pomiarów, ref. [9]).

Próby zastosowania innej metody celem uzyskania sekwencji centromerowych u gatunku bogatego w DNA – *Vicia faba* ($2n = 12$, $2C$ DNA = 26,7 pg) przez wycinanie tych fragmentów izolowanego DNA, które zostały wyznakowane przeciwciałem przeciwko CREST (autoprzeciwciało rozpoznające kinetochory) nie dało oczekiwanych wyników [21]. Warto zauważyć, że kilka lat później analogiczne podejście, ale z zastosowaniem przeciwciała przeciwko centromerowemu białku CENP-A doprowadziło do uzyskania sekwencji DNA centromerowego, obecnego w centromerach jelenia muntjaka (por. wyżej, 1) [54].

Podobna metoda została ostatnio użyta w próbach identyfikacji DNA centromerowego u jedyne go badanego dotąd przedstawiciela nagozależkowych – *Pinus densiflora*. DNA izolowany z regionów centromerowych i przylegających do nich odcinków chromosomów mitotycznych zawierał mieszaninę rozmaitych frakcji powtarzalnych, w tym 26S rDNA. FISH z zastosowaniem jako sond różnych sklonowanych sekwencji DNA ujawniła sygnały w niektórych prążkach heterochromatynowych; spośród użytych sond z DNA centromerowym hybrydyzowała tylko sekwencja rDNA [20]. Ten wynik jest podobny do uzyskanego drogą sekwencjonowania chromosomu nr 3 u *Arabidopsis thaliana* (por. 3.1 [46]).

Wszystkie uzyskane dotąd wyniki wskazują na całkowitą różnorodność sekwencji tandemowych wchodzących w skład DNA centromerowego, przy czym zaobserwowano pewną ich homologię w grupie spokrewnionych gatunków oraz zróżnicowanie w obrębie poszczególnych chromosomów tego samego gatunku.

3.1. DNA centromerowy u roślin dwuliściennych

Jak wspomniano wyżej, pierwszym gatunkiem, u którego sklonowano sekwencję DNA centromerowego, był *Arabidopsis thaliana*. U tego gatunku, po raz pierwszy na materiale roślinnym, została wykazana przez Maluszynską i Heslopa-Harrisona w 1991 r. [32] metodą FISH centromerowa lokalizacja sekwencji 180 pz (klon pAL1) we wszystkich centromerach chromosomów mitotycznych. W jądrach interfazowych autorzy ci stwierdzili obecność 10 sygnałów hybrydyzacyjnych, zaś w triploidalnych – 15. Autorzy ostrożnie sformułowali stwierdzenie, że sonda pAL1 daje sygnał hybrydyzacyjny blisko centromerów, ale jednocześnie wykazali, że heterochromatyna przycentromerowa – w przeciwieństwie do samych centromerów – daje jaskrawą fluorescencję po DAPI [32].

Dalsze badania umożliwiły pogłębienie wiedzy o strukturze molekularnej DNA centromerowego u *Arabidopsis thaliana*. Metodami molekularnymi wykazano, że jedna z rodzin powtarzalnych sekwencji tandemowych u *A. thaliana* zawiera monomery AS1, AS2 i wspomniany dimer AL1 z monomerami 180 pz. Rodzina ta została nazwana AtCon [45]. Sekwencje o wysokiej homologii do rodziny AtCon, rodzina AaKB27, została wyizolowana z blisko spokrewnionego gatunku – *Arabidopsis arenosa* (ref. [17]). Długie bloki powtórzeń 180 pz są niekiedy przedzielone innymi powtórzeniami. Jednorodne układy powtórzeń 180 pz osiągają długość ok. 0,6 Mpz [45].

Rodzina sekwencji AtCon, obecna w centromerach wszystkich 5 par chromosomów u *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia) zawiera tandemowe powtórzenia długości 178 pz [17]. Wyniki porównawczej analizy sekwencyjnej wielu tych kopii wykazały 95% homologii oraz obecność dwóch motywów długości 30 pz i 24 pz o 99% homologii. Sekwencje przy 3' końcu w tych motywach są podobne do sekwencji w centromerach drożdży i człowieka wiążących białko centromerowe CENP-B (por. 4). FISH z zastosowaniem pełnej długości klonu pAtMR1 jako sondy, zawierającego całą rodzinę AtCon, wykazała silną i w przybliżeniu jednakową hybrydyzację do wszystkich regionów centromerowych chromosomów metafazowych. Do analizy lokalizacji i zróżnicowania międzychromosomowego została zastosowana metoda PRINS (*Primed IN Situ*), polegająca na zastosowaniu starterów, analogicznie jak w metodzie PCR. W metodzie PRINS po przyłączeniu starterów, w tych doświadczeniach długości od 12 do 27 pz, do chromosomów *in situ*, w obecności polimerazy Taq i znakowanych dNTP następuje budowa sekwencji według wzorca w chromosomowym DNA. Dobór 7 par starterów oparto na wynikach PCR. Wykazano, że brak lub obecność sygnałów jest cechą poszczególnych par chromosomów homologicznych i jest charakterystyczny dla zastosowanych par starterów [17].

Skonstruowanie zintegrowanej cytogenetycznej mapy krótkiego ramienia chromosomu nr 4 *Arabidopsis thaliana* pozwoliło na pełne poznanie DNA centromerowego i heterochromatyny przycentromerowej. Centralną domenę w centromerze stanowią znane już tandemowe układy monomerów 180 pz, pomiędzy którymi znajdują się powtórzone sekwencje będące kopiami LTRów (*Long Terminal Repeats* – ref. [40]) retrotranspozonu *Athila* (z grupy *Ty3-gypsy*). DNA heterochromatyny przycentromerowej, jaskrawo fluoryzującej po DAPI, jak to wykazano wcześniej [32], składa się z ok. 700 kpz, zawierających tandemowe powtórzenia i rozproszone elementy sekwencji transpozonowych [10]. Obecność zgrupowań retro-transpozonów przy centromerach była stwierdzona wcześniej metodą FISH przeprowadzoną na zdekondensowanych włóknach chromosomowych (fiber-FISH, ref. [17]). W heterochromatynie przycentromerowej znajduje się również sekwencja mi167 obecna w genomie w zaledwie 90 powtórzeniach długości ok. 845 pz, zawierająca 19 odwróconych powtórzeń do 31 pz i 16 prostych powtórzeń długości do 16 pz [53].

Wyniki sekwencjonowania genomu *Arabidopsis thaliana* potwierdziły szczególną obfitość ruchomych elementów w heterochromatynie przycentromerowej; ich cytozyna jest wysoko zmetylowana (ref. [39]). Dalsze szczegóły organizacji centromerów i heterochromatyny przycentromerowej przyniosły wyniki sekwencjonowania wszystkich

5 chromosomów *Arabidopsis thaliana*. Rozmiar regionu centromerowego w chromosomie nr 1 został oceniony na 1,3 Mpz [52]. W chromosomie nr 2 w heterochromatynie przycentromerowej nagromadzone są retroelementy z rodzin *Ty3-gypsy* i *Ty1-copia* [31]. W chromosomie nr 3 rozmiary regionu centromerowego są rzędu 1,7 Mpz. W regionie tym, poza znanymi tandemowymi powtórzeniami 180 pz, stwierdzono obecność prawie doskonałych telomerowych powtórzeń i jeden zestaw pełnej jednostki rDNA (18S-5, 8S-25S) [46]. Bardziej szczegółowe wyniki uzyskano dla chromosomu nr 4, ponieważ metody poszerzono o FISH i barwienie DAPI na chromosomach pachytenowych, dzięki czemu wskutek mało zaawansowanej kondensacji chromatyny uzyskuje się większą rozdzielczość niż w silnie skondensowanych chromosomach w metafazie mitozy. Poza powtórzeniami tandemowymi 180 pz, w wewnętrznym odcinku obszaru centromerowego rozproszone sygnały po FISH wykazywały sekwencje o niskiej powtarzalności. Ponadto sygnały o niskiej powtarzalności zostały znalezione w bezpośrednim sąsiedztwie układów tandemowych 180 pz. W regionie centromerowym FISH z sekwencjami 5S rDNA, zgodnie z wynikami sekwencjonowania, dawała sygnały pozytywne [33]. Podobnie w chromosomie nr 5 – powtórzenia 180 pz są u niektórych ekotypów oflankowane przez zgrupowania sekwencji 5S rDNA. Przycentromerowa heterochromatyna zawiera retroelementy *Athila* [51]. Należy przypomnieć, że obecność 5S rDNA w regionie centromerowym u *Arabidopsis thaliana* została wcześniej wykazana metodą FISH na chromosomach metafazowych. U różnych ekotypów taka lokalizacja może występować w chromosomie nr 3 lub nr 5 [11, 35].

Przytoczone informacje wskazują na znaczną różnorodność sekwencji DNA w centromerach nawet u gatunku z tak małym genomem, jak *Arabidopsis thaliana*.

Diploidalne gatunki z rodzaju *Brassica* również charakteryzują się małym genomem – 2C rzędu 1,25 pg – i dlatego, poza przynależnością do tej samej rodziny co *Arabidopsis* (*Brassicaceae*), można było szczegółowo zidentyfikować u nich centromerowo-specyficzne sekwencje DNA.

Punktem wyjścia dla klonowania sekwencji DNA centromerowych były dwa gatunki diploidalne: *B. oleracea* ($n = x = 9$, genom CC) i *B. campestris* ($n = x = 10$, genom AA). Wstępne wyniki wykazały obecność u tych gatunków tandemowych sekwencji o długości monomerów 180 pz i 360 pz. Z sekwencji 360 pz z *B. oleracea* uzyskano klon *pBoKB1*, zaś z *B. campestris* – klon *pBcKB4*. Po zsekwencjonowaniu okazało się, że klony te różnią się pod względem struktury I-rzędowej. Metodą FISH wykazano, że obie sekwencje dają sygnały w centromerach. Jaskrawa fluorescencja po barwieniu DAPI heterochromatyny przycentromerowej pozwoliła na upewnienie się, że istotnie sygnały te pochodzą z DNA centromerowego. W warunkach wysokiej siły płukania (ang. *high stringency*) sonda z klonu *pBoKB1* u *B. oleracea* hybrydyzowała do centromerów 7 par chromosomów homologicznych, przy czym jedna para centromerów dawała wyraźnie silniejszy sygnał. W takich samych warunkach płukania klon *pBcKB4* również hybrydyzował z centromerami 7 par chromosomów. U *B. campestris* klon ten dawał sygnały hybrydyzacyjne w 7 parach chromosomów (w 9 – w warunkach niskiej siły płukania), ale tylko 4 większe i 2 mniejsze sygnały z klonem *pBoKB1*. Żadna z

tych sond nie dawała pozytywnych sygnałów u gatunku *B. nigra*, również diploidalnego ($n = x = 8$), ale z genomem BB. U trzech allotetraploidów, zawierających różną kombinację wymienionych ancestralnych gatunków diploidalnych (tzw. trójkąt U, ref. [40]), FISH z obiema sondami u *B. napus* ($n = 2x = 19$, genomy AACC) dawała pozytywne sygnały w liczbie bliskiej liczbie chromosomów, ale było ich mniej z sondą pBoKB1. U *B. carinata* ($n = 2x = 17$, genom BBCC) suma sygnałów pochodzących z obu klonów była niższa od liczby chromosomów. U *B. juncea* ($n = 2x = 18$, genomy AABB) dominującą liczbę sygnałów – w 8 parach chromosomów homologicznych – ujawniała sonda z *B. campestris*, natomiast sonda z *B. oleracea* dawała jeden silny sygnał w jednej parze chromosomów i w 10 parach chromosomów – słabe sygnały. Wyniki te wskazują, że centromerowe sekwencje DNA mogą być genomowo-specyficzne – dwa wspólne dla gatunków diploidalnych *B. oleracea* i *B. campestris* – i są obecne u gatunków allotetraploidalnych, jeżeli zawierają one genom, z którego sekwencje te zostały sklonowane [14]. Należy podkreślić, że podobnie jak w odniesieniu do 45S rDNA i jego ekspresji oraz 5S rDNA w trójkącie U (ref. [40]) pod względem ilościowym badane cechy nie są po prostu sumą cech charakteryzujących genomy ancestralne. Zróznicowane nasilenie sygnałów hybrydacyjnych u gatunków *Brassica*, podobnie jak u *Arabidopsis thaliana* [17] wskazuje na odmienną strukturę molekularną DNA centromerowego w poszczególnych chromosomach tego samego gatunku, ale taką samą w chromosomach homologicznych.

Nieco uwagi poświęcono obecności w regionach centromerowych sekwencji mikrosatelitarnych, które należą do grupy sekwencji tandemowych. U buraka cukrowego wśród 7 zbadanych sekwencji di-, tri- i tetranukleotydowych, wybiórczą lokalizację metodą FISH w regionach centromerowych wykazano dla $(CA)_8$ – w 16 wśród 18 chromosomów – i $(GATA)$ – w centromerach i przylegających regionach 6 chromosomów. Sekwencje $(GA)_{12}$ i $(TA)_{10}$ nie były obecne w regionach centromerowych [47]. U pomidora długie trakty sekwencji GATA są, podobnie jak u buraka cukrowego, zgromadzone w regionie centromerowym [3]. Brak jest dotąd informacji dotyczących ewentualnego znaczenia sekwencji mikrosatelitarnych w centromerach.

3.2. DNA centromerowy u roślin jednoliściennych

Głównym obiektem badań, zapewne ze względu na znaczenie użytkowe, były rośliny zbożowe i trzcina cukrowa, należące do rodziny *Gramineae*. Powszechnie obecnymi sekwencjami DNA w centromerach u roślin zbożowych są wykryte w 1996 r. sekwencje CCS1 [2] oraz Sau3A9 [23]. Następnie okazało się, że sekwencja Sau3A9, jak i szereg innych obecnych w centromerach zbóż, w tym specyficzna dla ryżu modyfikacja sekwencji CCS1, zawierają retrotranspozony. Należy podkreślić, że ruchome elementy stanowią znaczną część genomów traw. Większość z nich należy do subclassy z LTRami, do rodzin *copia* i *gypsy*. Wśród nich znaczna część jest aktywna, tj. ich geny ulegają transkrypcji (elementy autonomiczne) lub pochodzą z elementów pozbawionych wszystkich lub niektórych genów (elementy nieautonomiczne). Do autonomicznych należą retrotranspozony *copia* z grupy *BARE-1* (*Barley Retrotransposons*) powszechnej u *Triticeae* [56]. Retroelementy z rodziny *gypsy* – *Ty3-gypsy* mogą pochodzić

z elementów autonomicznych lub nieautonomicznych. Te pierwsze zapewne przemieszczały się do centromerów u wspólnego przodka *Poaceae*, w rezultacie czego nastąpiło ich szczególne zagęszczenie w przewężeniach pierwotnych [27]. Do rodziny *gypsy* należą retroelementy *cereba*, wykryte w centromerach jęczmienia (por. niżej, [22]). Nie wszyscy autorzy identyfikujący obecność rozmaitych retroelementów w centromerach przypisują je do konkretnej grupy retroelementów. Informacje takie, pochodzące z aktualizowanej bazy danych TREP (sierpień 2002) zostały podane przy tych retroelementach, co do których brak jest w publikacjach odpowiednich komentarzy.

Rodzina sekwencji CCS1 (*Cereal Centromeric Sequence*) została sklonowana z DNA *Brachypodium sylvaticum* (por. 3). Metodą FISH wykazano, że sekwencja ta jest obecna w centromerach pszenic (*Triticum vulgare* i *Aegilops comosa*), żyta, kukurydzy i ryżu, ale nasilenie sygnałów hybrydacyjnych jest u tych gatunków rozmaite, tj. zmniejszające się u poszczególnych gatunków w wymienionej kolejności. Dzieje się tak, ponieważ chromosomy ryżu są ok. 25 razy mniejsze od chromosomów pszenicy, a ponadto centromerowe sekwencje ryżu – RCS1 (*Rice Centromeric Sequence*) wykazują zaledwie 51% homologii do CCS1, zaś MCS1 (*Maize Centromeric Sequence*) kukurydzy – 48% homologii. U kukurydzy sygnały hybrydacyjne w centromerach tego samego gatunku wydają się być równie silne z sondą CCS1, jak i z sondą MCS1 (z wyjątkiem neocentromerów – por. 2) [2].

Wyniki analizy sekwencyjnej CCS1 wykazały obecność elementu 52–69 pz, który charakteryzuje się 80% homologią do motywu wiążącego białko CENP-B w ludzkim α -staelitarnym DNA (por. 4); sekwencja 17 pz w CCS1 zawiera 8 z 9 zasad niezbędnych do wiązania tego białka [2].

Seqwencja MCS1 u kukurydzy zawiera część LTRów podobnych do transpozonu CentA oraz do przedstawicieli tandemowych powtórzeń CentC. Między sekwencjami CentA i tandemowymi układami CentC znajdują się wcześniej zidentyfikowane retroelementy kukurydzy Huck i Prem2 (ten drugi jest zaliczany do elementów typu *copia* wg aktualizowanej bazy danych). Wyniki FISH wykazały, że występowanie elementów CentA i CentC jest ograniczone we wszystkich chromosomach kukurydzy do regionu centromerowego. Retroelementy Huck i Prem2 są rozproszone wzdłuż ramion chromosomów, przy czym elementy Huck znajdują się w większej koncentracji w centromerach. Stwierdzono ponadto, że chromosomowa organizacja CentA i CentC jest odmienna w poszczególnych chromosomach, co zostało dowiedzione poprzez analizy restrykcyjne i rozmieszczenie wzorów hybrydacyjnych po FISH [1].

Drugim rodzajem sekwencji odkrytej w 1996 r. jest wyizolowana z DNA (klonu w BAC) sorgo (*Sorghum bicolor*) powtarzalna sekwencja Sau3A9 długości 745 pz. Wyniki FISH wykazały, że element ten jest obecny również u innych zbóż, a także w chromosomie B żyta. Analiza intensywności sygnałów po FISH z Sau3A9 jako sondą wykazała jednak zróżnicowanie ich nasilenia, przypisywane odmiennej strukturze I-rzędowej. Nasilenie sygnałów przedstawia się następująco: sorgo > kukurydza > pszenica > owies > ryż. Sekwencja Sau3A9 jest nieobecna w DNA i centromerach roślin dwuliściennych, co zostało stwierdzone metodami hybrydacji Southern i FISH [23].

Z innego klonu BAC zawierającego DNA z *Sorghum bicolor* została sklonowana odmienna sekwencja – Sau3AI. Uzyskany z niej subklon Sau3A10 o długości 823 pz składa się z 6 monomerów zawierających ok. 137 pz; monomery te są zorganizowane w 3 dimery, które są względem siebie homologiczne w 79–82%, a monomery w obrębie dimerów – w 62–72%. Fragment DNA sklonowany w plazmidzie Sau3A10 jest oflankowany sekwencją docelową dla Sau3A (GATC), stąd jego nazwa. Sekwencja Sau3A10, jak wykazały wyniki FISH, hybrydują z centromerami wszystkich chromosomów *Sorghum bicolor*. Wyniki FISH przeprowadzonej na zdecondensowanych fibrylach chromatynowych wskazują, że sekwencja ta jest zorganizowana w bloki różnych rozmiarów. Najdłuższy z nich, z krótkimi rozproszonymi przerwami długości < 2 μm , osiąga 27,36 μm , co po odpowiednim wykalibrowaniu odpowiada 81 kpz i zawiera w przybliżeniu 590 monomerów z rodziny Sau3A10. Obok takich traktów były obecne dłuższe – 350 μm , ale z nieregularnymi przerwami rozmaitej długości. Sau3A10 hybryduje z genomowym DNA innych gatunków *Sorghum*: *sudanense*, *verticilliflorum*, *halepense*, *propinquum*, ale nie hybryduje z DNA genomowym *S. versicolor* i kukurydzy. Wyniki te wskazują, że sekwencja Sau3A10 – w przeciwieństwie do wcześniej opisanej Sau3A9 – wydaje się być specyficzna dla gatunków *Sorghum* z sekcji *Sorghum*, a nie występuje u gatunku z sekcji *Parasorghum* [34].

W centromerach ryżu obok tandemowych powtórzeń RCS1, 168 pz, będących fragmentami retrotranspozonów z grupy *gypsy*, znajdują się rodziny CCS1 i Sau3A9 (ref. [38]) oraz należące do tej grupy retroelementów RIRE7 [38]. RIRE7 są rozproszone głównie w traktach długości 320 pz, blisko tandemowych sekwencji RCS2. Obok RIRE7 w centromerach ryżu znajdują się liczne kopie innych retrotranspozonów typu *gypsy* – RIRE3 i RIRE8. Tandemowe sekwencje RCS2 w chromosomie 5 ryżu wydają się być zgrupowane w centralnej części centromeru [38]. W klonie RCS2 zidentyfikowano sekwencję satelitarną Cent0, zawierającą cztery tandemowo ułożone monomery o długości 154 i 165 pz (ref. [5]). Ostatnio [5] wykazano, że sekwencja Cent0 tworzy bloki tandemowe i wykazuje znaczny stopień homologii do CentC kukurydzy (por. wyżej). Wyniki FISH na chromosomach pachytenowych dowiodły, że sekwencja ta jest obecna wyłącznie w każdym z 12 chromosomów ryżu. Z pomiarów dokonanych po FISH na zdecondensowanych włóknach chromatynowych wynika, że zawartość sekwencji Cent0 w poszczególnych chromosomach wynosi od 1,418 do 816,3 kpz u podgatunku *japonica* i od 1,898 do 599 kpz u podgatunku *indica* [5]. Analogiczne badania przeprowadzone na telocentrycznych chromosomach ryżu, powstałych w wyniku pęknięcia chromosomów w regionie centromerowym wykazały, że centromery w takich chromosomach zawierają od 48 do 84% sekwencji Cent0 obecnych w normalnych chromosomach. Ponadto stwierdzono obecność w centromerach żyta specyficznego retrotranspozonu *CRR* z grupy *Ty3-gypsy*. *CRR* znajduje się na krańcach układów tandemowych Cent0. W porównaniu z centromerami, w śladowych zaledwie ilościach *CRR* jest obecny w ramionach chromosomów [5].

Do specyficznych gatunkowo sekwencji DNA centromerowych należy element AWRC1, wyizolowany z żyta, hybrydujący tylko do centromerów żyta, przy braku sygnałów w centromerach innych traw [28]. Fakt ten został wykorzystany w

doświadczeniach dotyczących DNA centromerów w translokacjach Robertsonowskich u pszenżyta. W metodzie FISH zastosowano dwie sondy: RCS1, sekwencję pochodzącą z ryżu, ale obecną również w centromerach pszenicy oraz sekwencję AWRC1, specyficzną dla żyta. W przypadku równego podziału/fuzji centromerów pochodzących z chromosomów każdego gatunku, sygnał po FISH z użyciem AWRC1 jako sondy był zlokalizowany wyłącznie we fragmencie centromeru z chromosomu żyta; druga część hybrydyzowała z sekwencją RCS1. Jeżeli cały centromer pochodził bądź z chromosomu żyta, bądź pszenicy, sygnały zawsze odpowiadały sekwencji DNA centromerowego tego gatunku, z którego pochodziło ramię chromosomu [59].

U trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum*, trawy – *Gramineae*) stwierdzono obecność centromerowych tandemowych sekwencji o długości monomeru 140 pz, zawierającego trzy motywy wiążące białko CENP-B (por. 4). Wśród 41 monomerów wchodzących w skład tych sekwencji tandemowych istnieją różnice w strukturze I-rzędowej; homologia wynosi od ponad 50% do blisko 100%, średnio 75% i dlatego te grupę powtarzalnych sekwencji nazwano „rodziną SCEN” (*Saccharum CENtromeric sequences*). Liczba kopii/genom haploidalny wynosi $2,6 \times 10^5$ i odpowiednio średnio $4,6 \times 10^3$ na chromosom. Metodą FISH z zastosowaniem jako sondy fragmentu DNA zawierającego 5 monomerów wykazano, że sekwencja ta jest specyficzną dla centromerów, ale przy wysokiej sile płukania sygnał był obecny nie we wszystkich chromosomach. Po zredukowaniu siły płukania wyznakowanych było 106 ze 112 chromosomów. Ponadto intensywność sygnału była różnaita. Metodą hybrydyzacji Southern nie stwierdzono obecności tych sekwencji u innych traw [46].

W badaniach opublikowanych w 2001 r. autorzy zajmują się niemal wyłącznie lokalizacją i charakterystyką retrotranspozonów obecnych w centromerach roślin zbożowych, wzbogacając wiedzę na ten temat uzyskaną w poprzednich latach. U pszenicy (*Triticum aestivum*) wykazano metodą FISH obecność w centromerach sekwencji *Tail*, ok. 560 pz (zaliczanej do tandemowych, niesklasyfikowanych retroelementów wg aktualizowanej bazy danych). Sekwencja ta została wcześniej wykryta w regionach subtelerowych u *Leymus racemosus*, gatunku należącego do *Triticeae*, (ref. [40]). Obok tej sekwencji stwierdzono u pszenicy występowanie retroelementu *Ty3/gypsy*. W centromerach poszczególnych chromosomów pszenicy znajdują się odmienne układy obu tych sekwencji. Sekwencje *Tail*, w różnej liczbie kopii, najczęściej były rozproszonymi grupami nietworzącymi układów tandemowych (w przeciwieństwie do strefy subtelerowej – ref. [40]). Taki układ został uznany za skutek aktywnej insercji sekwencji *Ty3/gypsy* do pierwotnie istniejących układów tandemowych *Tail*. W przeciwieństwie do sekwencji *Tail*, sekwencje *Ty3/gypsy* wydają się występować w podobnej liczbie kopii we wszystkich chromosomach, ponieważ intensywność sygnałów po FISH jest zbliżona [25]. Bliższa charakterystyka obecnych w centromerach pszenicy elementów podobnych do *Ty3/gypsy* wykazała, że zawierają one geny kodujące integrzę, zaś zastosowanie FISH na zdekondensowanych fibrylach chromatynowych umożliwiła stwierdzenie, że są one ułożone tandemowo, obecne w więcej niż 70 kopiach/centromer, przy czym jeden element występuje średnio na ok. 50–65 kpbz w obrębie wspomnianej wyżej sekwencji CCS1 [12].

U jęczmienia (*Hordeum vulgare*) w obrębie sekwencji Sau3A sklonowano element *cereba* (*centromeric retroelement of barley*) z rodziny *gypsy*. Element ten jest autonomiczny i hybrydyzuje ze wszystkimi centromerami jęczmienia (ref. [22]). Wyniki następných badań molekularnych i z zastosowaniem metody PRINS (por. 3.1.) wykazały, że retroelementy *cereba* występują w trzech kopiach w obrębie sekwencji 23 kpz i wraz z LTRami o długości ok. 1 kpz i sekwencjami satelitarnymi bogatymi w GC stanowią główny składnik centromerów jęczmienia. [22]. Zagęszczenie retroelementów w centromerach jęczmienia jest więc wyższe niż obliczone dla pszenicy (jeden z grupy *gypsy* na 55 kpz [12]) lub centromerów sorgum (dwa takie elementy w obrębie sekwencji długości 90 kpz, ref. [22]). U jęczmienia sekwencja mikrosatelitarna (GAA)_n jest zlokalizowana wokół centromerów (ref. [47]).

Przedstawione wyniki badań centromerów u traw wskazują, że u zbóż dominującym składnikiem są retroelementy z rodzin *copia* i *gypsy*. U zbóż, obok sekwencji wspólnych lub nieznacznie różniących się pod względem homologii, wykryto sekwencje specyficzne dla gatunku. W poszczególnych chromosomach tego samego gatunku intensywność sygnałów po FISH bywa zróżnicowana, co jest spowodowane nieco odmienną strukturą I-rzędową ich DNA. Różnice międzychromosomowe są wspólną cechą wszystkich zbadanych pod tym względem gatunków – zarówno w królestwie zwierząt, jak i roślin.

4. BIAŁKA CENTROMEROWE

Białka zaangażowane w funkcjonowanie centromerów – CENP (*CENTromeric Protein*) należą do dwóch klas. Pierwsze z nich to białka uczestniczące w strukturze centromerów i chromatyny centromerowej; białka te są odpowiedzialne za tworzenie kinetochorów i mogą regulować inne funkcje regionu centromerowego, takie jak: kondensacja chromatyny i kohezja siostrzanych chromatyd. Są to białka **konstrytutywne**, ponieważ znajdują się w centromerach podczas całego cyklu komórkowego. Do drugiej klasy białek – **fakultatywnych** (przejściowych) zaliczane są te białka, które uczestniczą w procesie formowania i funkcjonowania wrzeciona podziałowego oraz przemieszczania się siostrzanych chromatyd lub chromosomów homologicznych do przeciwległych biegunów podczas mitozy i mejozy ([8], ref. [13]). W tej części artykułu będą omawiane tylko białka zaliczane do pierwszej klasy, tj. CENP. Informacje na temat białek przynależnych do drugiej klasy można znaleźć w artykułach przeglądowych [8, 41, 42, 58]. Niektóre białka obu typów znajdują się w strukturze zwanej kompleksem centromer-kinetochor i dlatego są one zaliczane do CENP. CENP konstytutywnym przypisywany jest udział w montowaniu kinetochoru i/lub udział w jego dojrzewaniu (ref. [58]). Mimo pewnych różnic struktura kinetochoru u drożdży, zwierząt i roślin jest podobna, tj. trójwarstwowa, a poszczególnym warstwom przypisuje się obecność rozmaitych CENP (ref. [58]).

Do białek konstytutywnych należą CENP-A, CENP-B i CENP-C, do fakultatywnych – CENP-E, CENP-F, CENP-G i CENP-H. Obecność i lokalizację tych białek stwierdza się metodami immunocytochemicznymi z użyciem przeciwciał przeciwko poszcze-

gólnym białkom. Ogromna większość uzyskanych dotąd wyników dotyczy drożdży i zwierząt.

CENP-A jest podobne do histonu H3. Przypisuje się mu kluczową rolę w umiejscowieniu i podtrzymaniu struktury kinetochoru, znajduje się ono bowiem w chromatinie przylegającej do wewnętrznej warstwy kinetochoru. Jest ono prawdopodobnie obecne również u roślin, chociaż fakt ten nie został dotąd potwierdzony doświadczalnie. Homologiem tego białka u *Saccharomyces cerevisiae* jest Cs4, a u *Drosophila melanogaster* – CID. Stwierdzono jego brak w nieaktywnych centromerach w dicentrycznych chromosomach, natomiast występuje w neocentromerach u człowieka (ref. [13, 54, 58]).

CENP-B jest białkiem powszechnie występującym u ssaków, ale nieobecnym w pozbawionym centromerowych sekwencji α -satelitarnych w centromerze chromosomu Y u człowieka oraz w neocentromerach; natomiast jest obecne w nieaktywnym centromerze w dicentrycznych chromosomach (ref. [13, 44]). U wielu gatunków eukariotycznych w niektórych sekwencjach DNA wchodzących w skład centromeru istnieje motyw YYYYGTTNNAACRR (u człowieka) lub YYYYGTRCT-TCTAACRRRR (u *Arabidopsis thaliana*), gdzie Y = C lub T, N = dowolny nukleotydy, R = G lub A (ref. [17, 25]). U *Triticeae* DNA specyficzne dla centromerów zawierają motywy o znacznej homologii do tych sekwencji [2]. Obecność tego typu sekwencji stwierdzono również u *Arabidopsis thaliana* [17] i u trzciny cukrowej [36]. Występowanie CENP-B zostało stwierdzone u fasoli (*Phaseolus vulgaris*, ref. [58]). Występowanie tego białka w nieaktywnych centromerach w dicentrycznych chromosomach [13] oraz fakt, że brak genu kodującego CENP-B nie zakłóca ani powstawania kinetochorów, ani przebiegu mitozy [4], budzi wątpliwości co do znaczącej jego roli w funkcjonowaniu kompleksu centromer-kinetochor.

CENP-C jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek centromerowych u wielu gatunków, w tym również u roślin – u kukurydzy (z wyjątkiem neocentromerów – ref. [41]), bobu i jęczmienia (ref. [58]). Obecne jest ono tylko w aktywnych centromerach, a także w neocentromerach i w ludzkich minichromosomach, których centromery są pozbawione α -satelitarnego DNA (ref. [13, 41]). U ssaków CENP-C wiąże się bezpośrednio z DNA, dzięki czemu jest zlokalizowane w wewnętrznej warstwie kinetochoru. Jest ono obecne w ciągu całego cyklu komórkowego. Wiele dowodów wskazuje, że CENP-C jest niezbędne dla funkcjonowania kinetochoru. Homolog CENP-C u *Saccharomyces cerevisiae* – Mif 2p – jest podstawowym białkiem, które współdziała z centromerowym DNA. Uważa się, że podobnie jak CENP-C u wyższych *Eukaryota* pełni ono funkcję strukturalną we wczesnym etapie montowania kinetochorów. U kukurydzy zsekwencjonowano cDNA dla CENP-C; porównanie całości tej sekwencji z przewidzianą na tej podstawie sekwencją aminokwasów z banku genów *Arabidopsis thaliana* wskazuje na podobieństwo rzędu 37%. Największa homologia sekwencji kukurydzy i *Arabidopsis thaliana* oraz jedyny wyraźny region homologiczny między roślinami, zwierzętami i grzybami przypada na region zawierający 23 aminokwasy, zwany regionem I (ref. [58]).

CENP-E uważane jest za białko pośredniczące w przemieszczaniu się chromosomów do strefy równikowej wrzeciona podziałowego podczas prometafazy. Białko to jest nieobecne w nieaktywnym centromerze dicentrycznego chromosomu, natomiast jest obecne w neocentromerach (ref. [7, 13]). Obecność CENP-E stwierdzono w centromerach bobu i jęczmienia (ref. [58]).

CENP-F znajduje się – poza normalnymi centromerami – także w neocentromerach, ale nie występuje w nieaktywnych centromerach dicentrycznych chromosomów (ref. [13]). Jego obecność została stwierdzona u jęczmienia. Białko to znajduje się w jądrze podczas fazy G2 i przemieszcza się do kinetochorów podczas profazy, jest z nimi związane podczas metafazy i wczesnej anafazy, po czym zanika. CENP-F uczestniczy we wczesnych stadiach dojrzewania kinetochorów. Przeciwciała przeciw ludzkiemu CENP-F silnie reagują z roślinnymi kinetochorami, co sugeruje konserwatywny charakter tego białka (ref. [58]).

CENP-G zostało dotąd zidentyfikowane tylko u ssaków (ref. [41]). Znajduje się ono również w nieaktywnym centromerze w dicentrycznym chromosomie, a także w neocentromerach (ref. [13]). W chromosomach człowieka jest ono połączone z centromerami podczas interfazy cyklu komórkowego, po czym przemieszcza się do wewnętrznej płytki kinetochoru podczas mitozy (ref. [7]).

CENP-H jest ostatnio zidentyfikowanym, na razie tylko u ssaków, białkiem wewnętrznym kinetochorów (ref. [41, 49]).

Do białek centromerowych zaliczane jest INCENP (*Inner CENtromeRe Protein*). Należy ono do białek **fakultatywnych** (przejściowych), uczestniczy w segregacji chromosomów i w cytokinezie u zwierząt. Jest ono zlokalizowane w regionie centromerowym podczas metafazy i jest połączone z kinetochorem (ref. [49]). INCENP pojawia się w jądrze podczas fazy G2, po czym układa się wzdłuż ramion kondensujących chromosomów w profazie, następnie gromadzi się przy centromerach podczas prometafazy. Wraz z zapoczątkowaniem anafazy białko to opuszcza centromery i przemieszcza się do centralnej części wrzeciona, jednocześnie z zanikiem kohezji (por. 5) siostrzanych chromatyd. INCENP jest obecne także w nieaktywnym centromerze chromosomu dicentrycznego, chociaż – jak można wnosić z różnicy w nasileniu fluorescencji w badaniach immunocytochemicznych – występuje w ilości mniejszej niż w aktywnym centromerze [55].

Z przedstawionych danych wynika, że z grupy CENP konstytutywnych tylko CENP-A i CENP-C są obecne w aktywnych centromerach i w neocentromerach, natomiast CENP-B wydaje się nie odgrywać istotnej roli, ponieważ jest nieobecne w aktywnym centromerze chromosomu Y u człowieka, ale występuje w nieaktywnych centromerach dicentrycznych chromosomów. Z grupy CENP fakultatywnych do powstania w pełni funkcjonalnego kompleksu centromer-kinetochor niezbędne są CENP-E i CENP-F, zaś rola CENP-G i CENP-H, obecnych także w nieaktywnych centromerach, podobnie jak konstytutywne CENP-B, nie jest dotąd dostatecznie wyjaśniona.

5. KOHEZJA CHROMATYD W REGIONIE CENTROMERÓW

Niektóre białka wchodzące w skład kompleksu kohezyny (tj. białek uczestniczących w przyleganiu siostrzanych chromatyd) wiążą się prawdopodobnie z chromosomami za pośrednictwem specyficznych sekwencji DNA bogatych w AT (ref. [15]). Biorąc pod uwagę fakt, że rozdzielenie chromatyd siostrzanych następuje wcześniej niż podział centromerów (sygnalizujący początek anafazy) przyjmuje się, że podczas mitozy u wyższych *Eukaryota* kohezja i rozdzielenie ramion siostrzanych chromatyd i centromerów są regulowane odmiennie. Wśród białek uczestniczących w kohezji wyróżnia się białka związane z ramionami chromatyd oraz z centromerami (ref. [26, 43]). U *Drosophila melanogaster* zidentyfikowano białko MEI-S332, które gromadzi się wybiórczo w centromerach, jak to wykazano *in situ* metodą immunocytochemiczną [30]. Białko to pojawia się na centromerze podczas prometafazy, zanim nastąpi połączenie mikrotubul z kinetochorem, po czym odłącza się od centromerów w momencie zapoczątkowania anafazy (ref. [7, 15, 26, 43]). Natomiast u przedstawiciela niższych *Eukaryota*, *Schizosaccharomyces pombe*, specyficzne dla mejozy białko Rec 8 uczestniczy zarówno w kohezji chromatyd, jak i centromerów, przy czym zanika ono najpierw z ramion chromosomów, a z obszaru centromerowego – dopiero w anafazie II podziału mejotycznego (ref. [26]). W przeciwieństwie do rozdzielania ramion chromatyd, do separacji centromerów nie jest konieczna aktywność fosfatazy. Następną różnicą między mechanizmem rozdziału ramion chromatyd i ich centromerów została wykazana w doświadczeniach, w których zastosowano inhibitory topoizomerazy II: tworzenie wrzeciona i przemieszczanie się chromosomów do płaszczyzny równikowej odbywa się normalnie, ale w anafazie chromatydy rozdzielają się tylko w regionie centromerowym, pozostając nadal połączone ramionami, w wyniku czego powstaje jądro tetraploidalne (ref. [43]).

6. WNIOSKI

Dane dotyczące DNA centromerów wskazują na ogromną różnorodność dotąd zidentyfikowanych sekwencji. Pewne podobieństwo sekwencji centromerowych ogranicza się do wąskich grup, np. rząd Naczelnie, lub rodzajów, np. jelenie, *Arabidopsis*, czy dwa z trzech zbadanych diploidalnych gatunków *Brassica*. W dużej grupie roślin zbożowych głównymi (jeżeli nie jedynymi) sekwencjami centromerowymi są retroelementy, co zapewne jest związane z dominującym ich udziałem w genomie traw. Wspólną cechą centromerów wszystkich dotąd zbadanych gatunków są układy tandemowe sekwencji DNA oraz – w obrębie tego samego gatunku – pewne różnice w strukturze I-rzędowej budujących je monomerów w poszczególnych chromosomach. Trzecią, co prawda nie u wszystkich obiektów wykazaną cechą wspólną, jest obecność zdegenerowanej sekwencji 16–18-nukleotydowej, wiążącej białko CENP-B. Jednak brak tego białka w aktywnym centromerze chromosomu Y u człowieka, a także obecność

w nieaktywnych centromerach chromosomów dicentrycznych, budzi wątpliwości co do jego roli w funkcjonowaniu centromerów. Znaczący udział określonych sekwencji DNA centromerowego, poza ich układem tandemowym, również nie jest oczywisty, ponieważ DNA w aktywnym neocentromerze różni się znacznie od DNA obecnego w normalnym centromerze. Wątpliwości takie (*Centromeric DNA – is the sequence important?* [7]) są wysuwane przez wielu autorów [7, 42, 50, 57]. Należy jednak uwzględnić możliwość, że jeszcze nie zostały wykryte te sekwencje DNA, które mogłyby być obecne we wszystkich funkcjonalnych centromerach [57]. Wielkie nadzieje w tej sprawie są wiązane z konstrukcją sztucznych chromosomów, co – jak dotąd – napotyka na znaczne trudności u wyższych *Eukaryota*, zapewne ze względu na wielką różnorodność i obfitość sekwencji centromerowych, w przeciwieństwie do drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, u których jedyna sekwencja 125 pz funkcjonuje jako kinetochor. Przy konstruowaniu ludzkich sztucznych chromosomów (HAC) wykorzystuje się bądź pełne centromery chromosomów X i Y, bądź próbuje się wprowadzić sklonowane sekwencje centromerów [29].

Wielu autorów jest zdania, że wobec braku sekwencji konserwatywnych w poznanych dotąd centromerowych DNA, te rozpoznane dostarczają tylko część informacji koniecznych dla uruchomienia funkcji centromerów, a pozostała kontrola ma charakter epigenetyczny [19, 24, 42], przy czym strukturalną podstawą są układy tandemowe DNA [19, 42]. Na przykładzie neocentromerów w chromosomie Ab10 u kukurydzy (por. 2) sugeruje się, że znajdujące się w nich układy tandemowe mogą działać w układzie *trans* [19, 42]. Epigenetyczne mechanizmy przypisywane są powstawaniu funkcjonalnych neocentromerów u wielu innych organizmów (ref. [24, 42, 57]). Do tych mechanizmów może być zaliczony odpowiedni poziom acetylacji: wzmożony poziom acetylacji histonów powoduje zakłócenia w funkcjonowaniu kinetochorów u *Schizosaccharomyces pombe* [57]. Termin „kontrola epigenetyczna” jest używany przez wielu autorów, ale jego trafność w odniesieniu do funkcjonowania centromerów nie jest poparta dowodami doświadczalnymi.

Białko CENP-A obecne we wszystkich aktywnych centromerach (por. 4), będące wariantem histonu H3, może być uznane za kluczowy element determinujący wyznaczenie lokalizacji kinetochorów, co jest główną funkcją centromerów [41, 49, 50, 57]. U *Drosophila* jego analog CID warunkuje obecność w centromerach białka kohezyjnego (por. 5) MEI-S332 [49]. U *Caenorhabditis elegans* brak CENP-A uniemożliwia wiązanie białka CENP-E, istotnego dla przemieszczania się chromosomów podczas prometafazy (ref. [49]). W publikacji z 2002 r. [49] białko CENP-A zostało uznane za dominujące w hierarchii czynników regulujących istotną rolę centromerów i tworzenie kinetochoru. Identyfikacja białek współdziałających w obrębie chromatyny centromerowej z CENP-A i stwierdzenie, w jaki sposób białka CENP-A współdziałają z różnymi centromerowymi DNA, powinny być przedmiotem przyszłych badań, których wyniki ułatwią dalsze próby konstruowania sztucznych chromosomów, mających znaczenie w procedurach biomedycznych i w biotechnologii [49].

LITERATURA

- [1] ANANIEV EV, PHILIPS RL, RINES HW. Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays*) centromeric regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13073–13078.
- [2] ARAGÓN-ALCAIDE L, MILLER T, SCHWARZACHER T, READER S, MOORE G. A cereal centromeric sequence. *Chromosoma* 1996; **105**: 261–268.
- [3] ARESHCHENKOVA T, GANAL MW. Long tomato microsatellite are predominantly associated with centromeric regions. *Genome* 1999; **42**: 536–544.
- [4] BRINKLEY BR, VAN HOOSER A, MANCINI M, OUSPENSKI I, HE D, LOZANO G, MAY G. DNA-protein organization in the centromere-kinetochore complex of human chromosomes. [w] Lin CC [red.] Report on the First International Conference on the Mammalian Centromere. *Chrom Res* 1998; **6**: 581–593.
- [5] CHENG Z, DONG F, LANGDONT, OUYANG G, BUELL CR, GUM M, BLATTNER FR, JIANG J. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell* 2002; **14**: 1691–1704.
- [6] CHOO KHA, BARRY AE, LO AWJ, HOWMAN EV, LIAO GCC, EARLE E, du SART D, CANCELLA MR, SAFFERY R, CUTTS SM, MACDONALD AC, TAINTON K, IRVINE DV, HII L. Molecular properties of human centromeres and neocentromeres. [w] Lin CC [red.]. Report on the First International Conference on the Mammalian Centromere. *Chrom Res* 1998; **6**: 581–582.
- [7] CRAIG JM, EARNSHAW WC, VAGNARELLI P. Mammalian centromeres: DNA sequence, protein composition, and role in cell cycle progression. *Exp Cell Res* 1999; **246**: 249–262.
- [8] DOBIE KW, HARI KL, MAGGERT KA, KARPEN GH. Centromere proteins and chromosome inheritance: a complex affair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; **9**: 206–219.
- [9] DRAPER J, MUR LAJ, JENKINS G, GHOSH-BISWAS GC, BABLAK P, HASTEROK R, ROUTLEDGE PM. *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 2001; **127**: 1539–1555.
- [10] FRANSZ PA, ARMSTRONG S, DE JONG JH, PARNELL LD, VAN DRUNEN C, DEAN C, ZABEL P, BISSELING T, JONES GH. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* 2000; **100**: 367–376.
- [11] FRANSZ P, ARMSTRONG S, ALONSO-BLANCO C, FISCHER TC, TORRES-RUIZ RA, JONES G. Cytogenetics for the model species *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998; **13**: 867–876.
- [12] FUKUI K-N, SUZUKI G, LAGUGAH ES, RAHMAN S, APPELS R, YAMAMOTO M, MUKAI Y. Physical arrangement of retrotransposon-related repeats in centromeric regions of wheat. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 189–196.
- [13] GIMELLI G, ZUFFARDI O, GIGLIO S, ZENG C, HE D. CENP-G in neocentromeres. *Chromosoma* 2000; **109**: 328–333.
- [14] HARRISON GE, HESLOP HARRISON JS. Centromeric repetitive DNA sequences in the genus *Brassica*. *Theor Appl Genet* 1995; **90**: 157–165.
- [15] HEEMST D, HEYTING C. Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma* 2000; **109**: 10–26.
- [16] HENIKOFF S, AHMAD K, MALIK HS. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 2001; **293**: 1098–1102.
- [17] HESLOP-HARRISON JS, MURATA M, OGURA Y, SCHWARZACHER T, MOTOYOSHI F. Polymorphism and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes. *Plant Cell* 1999; **11**: 31–32.
- [18] HESLOP-HARRISON JS, MALUSZYNSKA J. Molecular Cytogenetics of *Arabidopsis*. [w] Meyerowitz EM, Sommerville CR [red.] *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994: 63–87.
- [19] HIATT EN, KENTNER EK, DAWE RK. Independently regulated neocentromere activity of two classes of tandem repeated arrays. *Plant Cell* 2002; **14**: 407–420.
- [20] HIZUME M, SHIBATA F, MARUYAMA Y, KONDO T. Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. *Chromosoma* 2001; **110**: 345–351.
- [21] HOUBEN A, BRANDES A, PICH U, MANTEUFFEL R, SCHUBERT I. Molecular-cytogenetic characterization of a higher plant centromere/kinetochore complex. *Theor Appl Genet* 1996; **93**: 477–484.

- [22] HUDAKOVA S, MICHALEK W, PRESTING GG, ten HOOPE R, dos SANTOS K, JASEN-CAKOVA Z, SCHUBERT J. Sequence organization of barley centromeres. *Nucl Acid Res* 2001; **29**: 5029–5035.
- [23] JIANG J, NASUDA S, DONG F, SCHERER CW, WOO S-S, WING RA, GILL BS, WARD DC. A conserved repetitive DNA located in the centromeres of cereal chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 14210–14213.
- [24] KARPEN G. Are centromere identity and function determined by an epigenetic mechanism? [w] Lin CC [red.]. Report on the First International Conference on the Mammalian Centromere. *Chrom Res* 1998; **6**: 584–585.
- [25] KISHII M, NAGAKI K, TSUJIMOTO H. A tandem repetitive sequence located in the centromeric region of common wheat (*Triticum aestivum*) chromosomes. *Chrom Res* 2001; **9**: 4170–428.
- [26] KURLANDZKA A. Tworzenie i rozpad kompleksu kohezyjnego chromatyd siostrzanych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 261–272.
- [27] LANGDON T, SEAGO C, MENDE M, LEGETT M, THOMAS H, FORSTER JW, THOMAS H, JONES RN, JENKINS G. Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. *Genetics* 2000; **156**: 313–335.
- [28] LANGRIDE P, GUO P, FRANCKI M, LANGRIDE U. Isolation of lambda and YAC clones from defined regions of rye genomes. *Mol Gen Genet* 1998; **257**: 586–575.
- [29] LARIN Z, MEJIA JE. Advances in human artificial chromosome technology. *Trends Genet* 2002; **18**: 313–319.
- [30] LeBLANC H, TANG TT-L, WU JS, ORR-WEAVER TL. The mitotic centromeric protein MEI-S332 and its role in sister-chromatid cohesion. *Chromosoma* 1999; **108**: 401–411.
- [31] LIN X i 32 wsp. Sequence analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 1999; **402**: 761–768.
- [32] MALUSZYNSKA J, HESLOP-HARRISON JS. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1991; **1**: 159–166.
- [33] MAYER K i 189 wsp. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 1999; **402**: 769–777.
- [34] MILLER JT, JACKSON SA, NASUDA S, GILL BS, WING RA, JIANG J. Cloning and characterization of a centromeric-specific repetitive DNA element from *Sorghum bicolor*. *Theor Appl Genet* 1998; **96**: 832–839.
- [35] MURATA M, HESLOP-HARRISON J, MOTOYOSHI JS. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *Plant J* 1997; **12**: 31–37.
- [36] NAGAKI K, TSUJIMOTO H, SASAKUMA T. A novel repetitive sequence of sugar cane, SCEN family, location on centromeric regions. *Chrom Res* 1998; **6**: 295–302.
- [37] NAPIERAŁA M. Sekwencje powtarzające się w genomie człowieka. [w] Krzyżosiak W [red.] Genom człowieka. PWN, Warszawa 1997: 56–69.
- [38] NONOMURA K, KURATA N. The centromere composition of multiple repetitive sequences on rice chromosome 5. *Chromosoma* 2001; **110**: 284–291.
- [39] OKAMOTO H, HIROCHIKA H. Silencing of transposable elemente in plants. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 527–534.
- [40] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych oraz ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 197–218.
- [41] PIDOUX AL, ALLSHIRE RC. Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 308–319.
- [42] RICHARDS EJ, DAWE RK. Plant centromeres: structure and control. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 130–135.
- [43] RIEDER C, COLE R. Chromatid cohesion during mitosis: lessons from meiosis. *J Cell Sci* 1999; **112**: 2607–2613.
- [44] ROSEN M, CASTILLEJO-LOPEZ C, EDSTROM J-E. Telomere terminating with centromere-specific repeats is closely associated with a transposon derived gene in *Chironomus pallidivittatus*. *Chromosoma* 2002; **110**: 532–541.
- [45] ROUND EK, FLOWERS SK, RICHARDS EJ. *Arabidopsis thaliana* centromere regions: genetic map positions and repetitive DNA structure. *Genome Res* 1997; **7**: 1045–1053.

- [46] SALANOUBA M i 134 wsp. Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 820–822.
- [47] SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8761–8765.
- [48] SHEN MH, ROSS A, YANG J, de las HERAS JI, COOKE H. Neo-centromere formation on a 2.6 Mb minichromosome in DT4O cells. *Chromosoma* 2001; **110**: 421–429.
- [49] SULLIVAN BA. Centromere round-up at the heterochromatic corral. *Trends Biotechnol* 2002; **20**: 89–92.
- [50] SULLIVAN KF. Structure and assembly of kinetochore chromatin. [w] Lin CC [red.]. Report on the First International Conference on the Mammalian Centromere. *Chrom Res* 1998; **6**: 590–591.
- [51] TABATA S i 128 wsp. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 823–825.
- [52] THEOLOGIS A i 83 wsp. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 816–819.
- [53] THOMPSON H, SCHMIDT R, BRANDES A, HESLOP-HARRISON JS, DEAN C. A novel repetitive sequence associated with the centromeric regions of *Arabidopsis thaliana* chromosomes. *Mol Gen Genet* 1996; **253**: 247–252.
- [54] VAFA O, SHELBY RD, SULLIVAN KF. CENP-A associated complex satellite DNA in the kinetochore of the Indian muntjac. *Chromosoma* 1999; **108**: 367–374.
- [55] VAGNARELLI P, EARNSHAW WC. INCEP loss from an inactive centromere correlates with the loss of sister chromatid cohesion. *Chromosoma* 2001; **110**: 393–401.
- [56] VICIENT C, JÄÄSELÄINEN MJ, KAENDAR R, SCHULMAN AM. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1283–1292.
- [57] WIENS GR, SORGER PK. Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* 1998; **93**: 313–316.
- [58] YU H-G, HIATT EN, DAWE RK. The plant kinetochore. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 542–547.
- [59] ZHANG P, FRIEBE B, LUKASZEWSKI AJ. The centromere structure in Robertsonian wheat-rye translocation chromosomes indicates that centric breakage-fusion can occur at different positions within the primary construction. *Chromosoma* 2001; **110**: 335–344.
- [60] ZOLLER JF, YANG Y, HERRMANN RG, HOHMANN U. Comparative genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis on plant chromosomes revealed by labeled *Arabidopsis* DNA. *Chrom Res* 2001; **9**: 357–375.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 17.09.2002 r.

Przyjęto: 09.10.2002 r.

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

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

KOMÓRKI C TARCZYCY I ICH ROLA

C CELLS OF THE THYROID GLAND AND THEIR FUNCTION

Jacek DADAN, Robert ZBUCKI

I Klinika Chirurgii Ogólnej oraz Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej
Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Należące do układu rozproszonych neuroektodermalnych komórek dokrewnych APUD komórki przypęcherzykowe C odgrywają istotną i nie do końca jeszcze wyjaśnioną rolę w utrzymaniu homeostazy całego organizmu. Każdy rok przynosi coraz to nowsze doniesienia ukazujące złożoność ich struktury oraz funkcji. Komórki C mają receptory dla wielu hormonów i są źródłem licznych peptydów regulacyjnych o działaniu auto-, para- i endokrynnym. Niektóre z nich, m.in. kalcytonina oraz somatostatyna mają istotne znaczenie praktyczne i znalazły zastosowanie w leczeniu wielu schorzeń. Wielonarządowa lokalizacja receptorów dla wspomnianych peptydów regulacyjnych wskazuje na możliwość ich ogólnoustrojowego, wielokierunkowego oddziaływania. Mają one zasadnicze znaczenie w regulacji metabolizmu wewnątrzkomórkowego, procesu wzrostu i różnicowania komórek, gospodarki wapniowo-fosforanowej, jak również wpływają na syntezę i uwalnianie innych hormonów. Zagadkowość oraz wielorakość funkcji komórek C stanowiło podstawę do podjęcia próby krótkiego przedstawienia aktualnego stanu wiedzy na ich temat.

Słowa kluczowe: Komórki C, peptydy regulacyjne, kalcytonina, receptor kalcytoninowy.

Summary: Parafollicular cells (C), belonging to dispersed neuroectodermal endocrine cells system (APUD), play important and not clearly explained part in homeostasis of all the organism. Every year brings newer and newer discoveries showing their structure and function complexity. C cells have receptors for various hormones and are the source of numerous regulating peptides of auto-, para- and endocrine activity. Some of them, among other calcitonin and somatostatin, have a practical meaning and are used in the treatment of many diseases. Multiorgan receptors localization for mentioned peptides suggests the possibility of systemic multidirectional reaction. They are of principal significance in intracellular metabolism regulation, cells growth and differentiation, calcium and phosphorus metabolism, and influence other hormones synthesis and release. The puzzle and multiple functions of C cells was the ground on which we have tried to present the current state of knowledge.

Key words: C cells, regulatory peptides, calcitonin, calcitonin receptor.

Komórki przypęcherzykowe, czyli komórki C gruczołu tarczycowego, ze względu na ich niezaprzeczną rolę w utrzymaniu homeostazy całego organizmu pozostają nadal w kręgu zainteresowań wielu badaczy. Ich czynnościową odrębność w tarczycy opisywali wcześniej niektórzy autorzy, jednak dopiero Pearse, w 1966 roku wskazał na grzebienie nerwowe, jako na pierwotne źródło prekursorów komórek C, włączając je tym samym do układu rozproszonych neuroektodermalnych komórek dokrewnych [61,62]. Ze względu na posiadaną przez wszystkie te komórki zdolność gromadzenia prekursorów amin biogennych i ich dekarboksylacji, Pearse zaproponował zaliczyć je do układu „APUD” (*amine precursor uptake and decarboxylation*) [61]. Zdaniem wielu autorów za ektodermalnym pochodzeniem komórek C mają przemawiać wykrywane w nich substancje typowe dla komórek nerwowych, cechy morfologiczne i mechanizm APUD [8,14,40,59].

W badaniach przy użyciu technik radioimmunologicznych (RIA) wykazano, że komórki produkujące kalcytoninę pojawiają się w tarczycy u ludzi już około czternastego tygodnia życia płodowego, tj. przed rozwojem struktur pęcherzykowych i ich ilość stopniowo wzrasta. Ponadto zaobserwowano brak różnic w lokalizacji oraz w liczbie komórek C między płodami rozwiniętymi prawidłowo i aencefalicznymi [45]. Obserwacje te mogą wskazywać, że czynniki ośrodkowe nie są konieczne do prawidłowego rozwoju i dojrzewania komórek C. Fizjologiczne znaczenie tak wczesnego pojawienia się komórek C nie jest do końca wyjaśnione. Prawdopodobnie obecna w wieku płodowym kalcytonina może odgrywać istotną rolę w procesie osteogenezy, chociaż obecność ognisk kostnienia stwierdza się już w ósmym tygodniu życia płodowego, a więc wcześniej niż komórek uwalniających kalcytoninę. Ponadto w pierwszym trymestrze ciąży stężenie wapnia w osoczu płodu jest obniżone, co może sugerować, że wapń nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na uwalnianie kalcytoniny [45]. Dodatkowo czynniki odpowiedzialne za powstanie wola nawrotowego również pozostają bez wpływu na komórki C [67].

Ultrastruktura komórek C jest bardzo podobna u wszystkich badanych gatunków ssaków i wyraźnie różni się od ultrastruktury komórek pęcherzykowych (F) tarczycy. Istotną jej cechą są liczne, okrągłe, gęste elektronowo, otoczone pojedynczą błoną ziarna wydzielnicze [43,70]. Zabel i wsp., wykrywając kalcytoninę (CT) i somatostatynę (ST) w skrawkach tarczycy szczura stwierdzili, że komórki C wytwarzające jednocześnie CT i ST magazynują te peptydy łącznie w tych samych ziarnach cytoplazmatycznych [3,97]. Komórki C przylegają ściśle do podstawy komórek F, nie występują jednak między nimi desmosomy lub inne typowe dla nabłonków połączenia. Błona podstawna jest wspólna dla pęcherzyka i przyległych do niego komórek C. Niektórzy badacze wyróżniają specjalne czynnościowe zespoły strukturalne tarczycy w postaci gron pęcherzyków (epiteliomerów), leżących w odpowiednio rozgałęzionej przestrzeni otoczonej wspólną błoną podstawną [88].

Komórki C mają liczne receptory błonowe i cytoplazmatyczne. Ostatnio coraz częściej zwraca się uwagę na znaczenie ekspresji błonowych receptorów wapniowych oraz somatostatynowych w prawidłowych i zmienionych nowotworowo komórkach przypęcherzykowych. Stwierdzono, że za pośrednictwem receptorów wapniowych i

kinazy białkowej C (PKC) wzrost stężenia wapnia zjonizowanego w przedziale pozakomórkowym jest czynnikiem stymulującym do uwalniania zarówno kalcytoniny, jak i serotoniny (5-HT) [24, 33,44,46,73,96]. Nadmiar jonów wapniowych zwiększa sekrecję kalcytoniny, nie wpływając przy tym bezpośrednio na ekspresję genu CT/CGRP (CGRP – peptyd pochodny genu CT). Hyperkalcemia tylko na początku prowadzi do wzrostu stężenia kalcytoniny w osoczu, jeżeli utrzymuje się przez dłuższy czas, pozostaje bez wpływu. Zastosowanie jonoforów Ca^{++} lub aktywatorów kanału wapniowego zwiększa wychwyty jonów wapniowych przez komórki C oraz powoduje wzmoczoną sekrecję kalcytoniny, a blokery kanału wapniowego hamując wychwyty tych jonów redukują zarówno podstawowe, jak i stymulowane przez jony wapniowe uwalnianie kalcytoniny [63]. Celem wyjaśnienia mechanizmu uwalniania kalcytoniny posłużono się fenytoiną i lignokainą, związkami wpływającymi na stabilizację błony komórkowej. Okazało się, że miejscowe zastosowanie tych związków nie powodowało zmiany podstawowego stężenia kalcytoniny, natomiast hamowało stymulowane przez jony wapniowe, glukagon i pentagastrynę uwalnianie kalcytoniny zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [16,41,63,74].

Receptory somatostatyny są obecne w prawidłowej oraz zmienionej chorobowo tkance tarczycowej, aczkolwiek ich udział w regulacji procesów wzrostowych nie jest do końca wyjaśniony [23,49,98]. Ze znanych pięciu podtypów receptorów somatostatynowych, podtyp drugi i piąty (STR2 i STR5) mają podstawowe znaczenie w procesach proliferacyjnych. Zastosowanie selektywnego agonisty STR2 powoduje zahamowanie wychwyty znakowanej tymidyny oraz hamuje proliferację komórek C. Przeciwnie, selektywny agonista STR5 zwiększa wychwyty tymidyny oraz syntezę DNA, nie wpływając przy tym na proliferację komórek C. Efekt zależny od pobudzenia obu receptorów wskazuje na możliwość interakcji między nimi, tym bardziej że agonista STR5 znosi skutki zależne od pobudzenia STR2 i odwrotnie [23,98]. Obecność receptorów somatostatynowych w komórkach C, a także w innych komórkach neuroendokrynnych umożliwia zastosowanie analogów somatostatyny (octreotyd, lanreotyd) zarówno w terapii, jak i w diagnostyce klinicznej, szczególnie w przypadku wykrywania nowotworowych zmian przerzutowych z zastosowaniem scyntygrafii [5,42,84,90].

W zwierzęcym modelu doświadczalnym hiperprolaktynemii zaobserwowano podwyższone stężenie kalcytoniny w osoczu, zależne od zwiększonego uwalniania hormonu przez gruczoł tarczowy za pośrednictwem cAMP, aczkolwiek inkubacja gruczołu tarczowego w obecności prolaktyny (PRL) nie wpływa na czynność komórek okołopęcherzykowych. Na podstawie tych badań wysunięto wniosek, że PRL w sposób bezpośredni nie oddziałuje na komórki C, lecz prawdopodobnie wpływa na wydzielanie nieznanego jeszcze czynnika stymulującego uwalnianie kalcytoniny [47].

Poza receptorami błonowymi komórki C mają receptory wewnątrzkomórkowe. I tak np. Naveh-Many i wsp. wykazali obecność wewnątrzkomórkowych receptorów dla estrogenów, a zdolność komórek C do syntezy mRNA dla receptora estrogenowego została potwierdzona przy użyciu PCR (*polimerase chain reaction*) [84]. Stwierdzono, że u szczurów po usunięciu jajników ulega obniżeniu ilość CT-mRNA w komórkach

przypęcherzykowych, natomiast podanie egzogennych estrogenów zwiększa zawartość zarówno CT, jak i CT-mRNA [84]. Udokomuntowano także, że podawanie estradiolu szczurom we wczesnym okresie życia prowadzi do hyperplazji i degranulacji komórek C [78]. Sekulić i wsp. na podstawie własnych badań stwierdzili, że przewlekłe podawanie estradiolu 14-miesięcznym szczurom powoduje obniżenie ilości oraz wielkości komórek C, co znajduje odbicie w postaci zmniejszonego stężenia CT w osoczu [78].

Na ekspresję genu CT/CGRP wpływa również aktywny metabolit witaminy D3 – kalcytriol (1,25dihydroksycholekalcyferol), hamujący transkrypcję genu CT [22,58]. Natomiast kalcytonina zwiększa syntezę kalcytriolu w kanalikach proksymalnych nefronów [53,81,93]. W ten sposób realizowany jest jeden z mechanizmów zabezpieczających przed nadmiernym wydzielaniem CT.

Wyniki badań z ostatnich dwóch dziesięcioleci dowodzą, że poza podstawowym stymulującym działaniem przysadkowego TSH na komórki F tarczycy, istnieją także lokalne mechanizmy regulacyjne wynikające z oddziaływań parakrynych i autokrynych między komórkami dokrewnymi tego gruczołu. Kluczową rolę w tych mechanizmach regulacyjnych odgrywają komórki C. W literaturze coraz częściej jest podkreślana możliwość współpracy pomiędzy komórkami F i komórkami C gruczołu tarczowego, poprzez ich bezpośredni kontakt oraz za pośrednictwem uwalnianych hormonów, m.in. peptydowych, zwanych inaczej peptydami regulacyjnymi (PR) [72,94,95]. Komórki C są źródłem licznych peptydów regulacyjnych, które mogą oddziaływać w drodze auto-, para- i endokrynej [7,15,18,92]. Podanie dokładnej listy peptydów regulacyjnych jest dość trudne, ze względu na to, że jest ona zmienna i zależna od wieku, płci oraz kondycji zdrowotnej [9,30,31,48,89]. Ponadto w życiu osobniczym zmienia się zarówno liczebność komórek C tarczycy, jak też profil syntetyzowanych przez nie hormonów. W badaniach doświadczalnych udowodniono, że u płodów i noworodków szczura większość komórek przypęcherzykowych syntetyzuje somatostatynę wraz z kalcytoniną, a tylko niektóre z nich samą kalcytoninę. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia u dojrzałych szczurów, u których większość komórek syntetyzuje kalcytoninę, a tylko niektóre również ST [72].

Ustalono również, że poza ST i CT komórki C mogą także syntetyzować i wydelać inne peptydy regulacyjne, m.in. katakalcyny: I (CCP-I) i II (CCP-II), peptyd uwalniający gastrynę (GRP), tyreoliberynę, grelinę oraz heloderminę, a wyraźne zmiany zestawu wydzielanych PR są obserwowane w stanach patologicznych, szczególnie przy rozrostach nowotworowych [27,32,38,71,77]. Produktem komórek C są ponadto PR charakterystyczne dla układu nerwowego, takie jak np. CGRP, fragment N-końcowy – pochodzący z produktu ekspresji genu CT/CGRP, neuromedina, cholecystokininina (CCK), peptyd wydzielniczy I (SP-I, chromogranina A), naczynioruchowy peptyd jelitowy (VIP), neuropeptyd Y oraz peptyd histydylo-metionylowy (PHM) [29,71,72]. Za syntezę niektórych z powyższych peptydów regulacyjnych odpowiada ekspresja genów CT/CGRP, SP-I oraz PHM/VIP i TRH. W komórkach C z genu PHM/VIP powstaje wazoaktywny peptyd jelitowy, natomiast z genu SP-I jest wytwarzana duża cząsteczka (pro-SP-I), która w komórkach

dokrewnych jest enzymatycznie cięta na mniejsze peptydy regulacyjne. Między innymi powstaje peptyd mający zdolność hamowania uwalniania kalcytoniny, złożony z aminokwasów leżących w pozycji 1-40 pro-SP-I [72].

Ze złożonego z sześciu eksonów genu CT/CGRP, w wyniku transkrypcji powstaje pierwotny transkrypt, czyli pre-mRNA (hn RNA), z którego formowane są dwa rodzaje mRNA: CT-mRNA I oraz CGRP-mRNA. Pierwsze trzy eksony są wspólne, czwarty jest charakterystyczny dla CT-mRNA, a piąty i szósty są charakterystyczne dla CGRP-mRNA. Ekspresję tego genu, poza gruczołem tarczycowym, stwierdzono również w ośrodkowym układzie nerwowym oraz w komórkach dokrewnych układu pokarmowego i oddechowego [20]. CT-mRNA powstaje głównie w gruczole tarczycowym, natomiast CGRP-mRNA dominuje w pozostałych tkankach. Wykazano także produkcję kalcytoniny w komórkach kłębuszków szyjnych u człowieka i małpy oraz w neuroendokrynnych komórkach płuc szczura. Doświadczenie wykonane *in vitro* w obecności fibroblastów, komórek C oraz komórek F i C stworzyło podstawę wyjaśniającą różnice w ekspresji genu CT/CGRP w komórkach znajdujących się w różnych tkankach. Okazało się, że fibroblasty promują powstawanie głównie CGRP, podczas gdy komórki pęcherzykowe wpływają na powstawanie CT. Stąd wniosek, że nie tylko czynniki humoralne, ale i bezpośredni kontakt komórkowy ma wpływ na ekspresję genu CT/CGRP [94,95].

W gruczole tarczycowym dochodzi również do wytwarzania z genu CT/CGRP, w niewielkich ilościach, CT-mRNA II, z którego w wyniku translacji powstaje II prekursor kalcytoniny, różniący się od pierwszego sekwencją ośmiu końcowych aminokwasów. Po jego enzymatycznym rozbiciu powstaje katakalcyna II (CCP II), natomiast z CT-mRNA I, poza kalcytoniną, katakalcyna I (CCP I). Z CGRP-mRNA powstaje prekursor CGRP, z którego w wyniku działania enzymów proteolitycznych powstaje CGRP. Poza tym oba wyżej wymienione prekursory kalcytoniny, jak również prekursor CGRP są źródłem peptydu N-końcowego [26,72].

W zmienionych nowotworowo komórkach C tarczycy stwierdzono ekspresję genu TRH, a nieco później okazało się, że produkt tego genu (255-aminokwasowy prepro TRH, zawierający pięć kopii TRH oraz siedem kopii peptydów niebędących TRH) występuje również w komórkach zdrowych. Fakt ten sugeruje możliwość parakrynną regulacji produktu genu TRH w obrębie tarczycy, aczkolwiek ekspresja tego genu charakterystyczna jest dla komórek podwzgórza [27,72].

Funkcja peptydów regulacyjnych wytwarzanych w tarczycy nie jest do końca wyjaśniona, tym bardziej że często są one wydzielane łącznie. Obserwowano, że CGRP działając autokrynnie stymuluje uwalnianie CT. Ponadto zauważono, że CGRP, CT i katakalcyna, podane myszom oddzielnie, nie wpływają na sekrecję hormonów tarczycy, natomiast podane łącznie działają hamująco na ich sekrecję, również po stymulacji przez TSH. Stymulowaną przez TSH sekrecję hormonów hamuje także uwalniana z komórek C w drodze parakrynną somatostatyna, natomiast VIP uwalniany z komórek C, a także na zakończeniach wewnątrz-tarczycowych włókien nerwowych oddziałuje silnie stymulująco. Ten stymulujący efekt znosi wydzielany przez tyreocyty peptyd natyretyczny w drodze autokrynną [70,72].

Trudno ustalić, kiedy występuje bezpośrednio działanie danego peptydu regulacyjnego na komórki dokrewne tarczycy, a kiedy jest to wpływ pośredni. I tak np. CGRP może działać przez rozszerzenie naczyń i jednocześnie przez występujące w komórkach F i C swoiste dla niego receptory [60,72]. Poza tym CGRP pochodzący z peptyderygicznych zakończeń nerwowych jest wydzielany łącznie z innymi PR. Dlatego też nie obserwuje się jego samodzielnego działania na terenie tarczycy, a próby ścisłego określenia tu jego funkcji dają różne wyniki w różnych modelach doświadczalnych. W jednych eksperymentach obserwowano np. stymulujący wpływ CGRP na wydzielanie CT i w pewnych warunkach także na wydzielanie T4 i T3, a w innych przypadkach stwierdzano, że CGRP, CT i katakalcyna nie wpływają na sekrecję hormonów tarczycowych, natomiast podane łącznie wywierają efekt hamowania stymulowanej przez TSH sekrecji tych hormonów. Wykazano ponadto, że CGRP i CT działając łącznie hamują procesy wzrostowe w tarczycy [70,72].

Funkcja somatostatyny (ST) w tarczycy została dobrze poznana. Wpływa ona bezpośrednio hamująco na stymulowaną przez TSH sekrecję hormonów w komórkach F [70,72]. ST hamuje także silnie procesy wzrostowe w tarczycy oraz obniża wydzielanie CT [72,99]. Bardzo podobne, lecz nieco słabsze działanie w tarczycy wykazuje neuropeptyd Y (NPY) [70,72]. Modulujący wpływ na sekrecję CT wywierają również aminy biogenne i ich prekursorzy. I tak dihydroxy-1-fenylalanina oraz serotonina, w warunkach *in vivo*, zwiększają wydzielanie CT, natomiast tryptofan i dopamina – hamują [96].

VIP jest najsilniejszym stymulatorem sekrecji hormonów tarczycowych. Działa on pośrednio, przez silne rozszerzanie naczyń włosowatych, jak też bezpośrednio wiążąc się z receptorami komórek F. W warunkach naturalnych VIP działa jednak zawsze łącznie z innymi PR. PHI ma podobne, ale o wiele słabsze od VIP działanie. Podobne spostrzeżenia odnoszą się również do heloderminy, GRP oraz SP [70,72].

Kalcytonina jest 32-aminokwasowym hormonem uwalnianianym przez komórki przypełcherzykowe o złożonej, chociaż nie do końca jeszcze poznanej funkcji auto-, para- i endokrynej. Główna jej rola polega na obniżaniu stężenia wapnia zjonizowanego przez hamowanie aktywności resorbcyjnej osteoklastów oraz przez wzrost wydalania Ca^{+2} przez nerki [10,36,50,64,86]. W badaniach doświadczalnych zauważono, że u homozygotycznej myszy, pozbawionej genu kodującego kalcytoninę, rozwija się osteopenia, podkreślano jednocześnie rolę tego hormonu w homeostazie tkanki kostnej *in vivo* [34]. Ze względu na zdolność obniżania stężenia wapnia zjonizowanego oraz wpływ na tkankę kostną kalcytonina znalazła zastosowanie między innymi w leczeniu stanów przebiegających z hiperkalcemią, w chorobie Pageta i osteoporozie [6,75].

Zarówno endo-, jak i egzogenna kalcytonina wywiera swój efekt za pośrednictwem receptorów błonowych, związanych z heterotrimerycznym białkiem G (Gi,Gs,Gq), które zidentyfikowano w wielu tkankach [12,28,55,56,79]. Receptor kalcytoninowy (CTR – *calcitonin receptor*), należący do rodziny receptorów serpentynowych, tworzą trzy zasadnicze fragmenty: zewnątrzkomórkowy, śródbłonowy oraz wewnątrzkomórkowy [54]. Jego podstawowe izoformy C1a i C1b, różniące się obecnością lub

brakiem dodatkowego fragmentu aminokwasowego, są wynikiem alternatywnego składania eksonów (*splicing*) [28,35]. U człowieka większa izoforma C1a zawiera dodatkowy 16-aminokwasowy odcinek w pierwszej, wewnątrzkomórkowej domenie, natomiast u szczura dodatkowy fragment obecny jest w drugiej domenie zewnątrzkomórkowej i obejmuje odcinek 37-aminokwasowy [2,35]. Izofory C1a i C1b po połączeniu z ligandem mają zdolność aktywacji cykazy adenylanowej za pośrednictwem związanego z receptorem białka regulatorowego G [4,11,52]. Efektem tego jest powstanie wtórnego przekaźnika w postaci cAMP, który z kolei aktywuje kinazę białkową A (PKA), odpowiedzialną za fosforylację białek [4,11,35,52,69]. Jedynie po połączeniu liganda z izoformą receptora C1a zostaje aktywowana fosfolipaza C (PLC), która katalizuje rozkład 4,4 difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) i powstanie diacyloglicerolu (DAG) oraz 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP3). W następstwie tego procesu wzrasta stężenie wapnia zjonizowanego w cytoplazmie, który po połączeniu z cytoplazmatycznym białkiem receptorowym – kalmoduliną aktywuje szereg kinaz białkowych, odpowiedzialnych za efekty zależne od pobudzenia receptora. Diacyloglicerol aktywuje kinazę białkową C (PKC), co powoduje fosforylację białek enzymatycznych, a w dalszej kolejności zmiany czynności komórki [11,35,52,69].

Kolejnym sposobem przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem mniejszej izoformy CTR jest aktywacja fosfolipazy D (PLD), obserwowana *in vitro* w świńskich komórkach nabłonka kanalika nerkowego. Kalcitonina stymuluje powstanie kwasu fosfatydylowego, produktu hydrolizy fosfatydylocholiny, który ulega konwersji do DAG przy udziale specyficznej fosfatazy. Zwiększone stężenie DAG w cytozolu komórki jest wynikiem aktywacji zarówno fosfolipazy D, jak i fosfolipazy C, jakkolwiek PLD odpowiada za przedłużenie powyższego efektu [57].

W ostatnim czasie prowadzono badania na ludzkich płodowych komórkach nerkowych (HEK293 – *human embryonic kidney cells*) transfekowanych wektorem króliczych receptorów C1a lub CTR Δ e13 [69]. Okazało się, że kalcitonina, zależnie od jej stężenia, znacznie zwiększa wpływ jonów H^+ z komórki. Reakcja dotyczy jedynie komórek z ekspresją receptora C1a i jest dwufazowa: pierwsza pojawiająca się w ciągu kilku minut i równie krótko trwająca, druga, trwająca znacznie dłużej. Zastosowanie selektywnego inhibitora izoformy NHE-1 (wymieniacz sodowo-protonowy – izoforma 1) – kariporidu potwierdza znaczenie wspólnego transportera jonów: sodu i protonu, jako jednego z mechanizmów, za którego pośrednictwem kalcitonina reguluje pH cytoplazmy i bierze udział w transporcie przez błonowy jonów. Kariporid hamuje wpływ jonów H^+ w czasie pierwszej fazy, podkreślając znaczenie wymiennika Na^+/H^+ jako jednego z mechanizmów regulujących wpływ jonów H^+ poza komórkę. Aktywacja przez kalcytyninę powyższego mechanizmu może odgrywać rolę w regulacji resorpcji Na^+ i sekrecji H^+ w kanalikach nerkowych [69,83]. W osteoklastach aktywacja Na^+/H^+ może obniżyć dostępność protonów dla wakuolarniej pompy protonowej (H-ATP-azy), co wpływa na obniżenie aktywności resorbcyjnej komórek [69]. Druga faza wpływu protonów zależna jest od zwiększonego pod wpływem kalcytyniny metabolizmu glukozy i powstawania kwasu mlekowego.

Sama kalcytonina nie zwiększa wychwyty glukozy przez komórkę [69]. Zarówno wzrost stężenia cAMP jako wyraz pobudzenia receptorów (C1a, Δ e13), jak i wzrost stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie komórki, obserwowany po pobudzeniu receptora C1a nie wpływa na wypływ jonów H^+ , a nawet w przypadku Ca obniża ich stężenie poniżej wartości zanotowanych w grupie kontrolnej. Zastosowanie aktywatorów PKC, w odniesieniu do komórek wyposażonych w receptor C1a lub Δ e13, naśladuje drugą fazę odpowiedzi zależnej od kalcytoniny. Jednoczesne umieszczenie komórek w środowisku pozbawionym glukozy lub wcześniejsze podanie inhibitora kinazy białkowej C znacznie ogranicza ten efekt [69].

Różnice w lokalizacji obu izoform receptora kalcytoniny oraz w sposobie przekazywania sygnału mogą być odpowiedzialne za efekty zależne od jego pobudzenia. Podsumowując należy podkreślić, że aktywacja receptorów związanych z białkiem G bierze udział w regulacji wielu procesów, między innymi: wzrostu i różnicowania komórek, transportu jonów i metabolizmu komórki. Transport jonów odgrywa istotną rolę w procesach zależnych od kalcytoniny, między innymi w przebudowie tkanki kostnej, homeostazie wapniowej, równowadze kwasowo-zasadowej oraz w transepitelialnym przemieszczaniu jonów w kanalikach nerkowych, jednakże wiedza na ten temat jest jeszcze niepełna. Jeden z dwóch mechanizmów sekrecji protonów do światła kanalika nerkowego (Na/H, H^+ -ATP-aza) może być również regulowany przez kalcytoninę [69,83].

Kalcytonina hamuje proliferację oraz procesy wzrostowe komórek ludzkich *in vitro*. Połączenie ligandu z receptorem zmniejsza aktywność kinazy cyklinozależnej (Cdc 2) poprzez ekspresję jej inhibitora – białka p21. Wynikiem tego jest zatrzymanie komórki w fazie G_2 [21]. Powyższy mechanizm zależny jest od aktywacji szlaku Erk1/2 MAPK, za pośrednictwem białka regulatorowego zarówno G_q , jak i G_i , co zostało potwierdzone po zastosowaniu inhibitora białka G_i – toksyny krztuścowej oraz inhibitora PKC. Aktywacja szlaku Erk1/2 MAPK oraz wpływ na transkrypcję za pośrednictwem białka G_i zachodzi przy udziale białka adaptorowego ras i raf oraz w wyniku znoszenia hamującego wpływu białka Rap1 na szlak Erk1/2 MAPK [13,65].

Lokalizacja CTR w ośrodkowym układzie nerwowym została potwierdzona silną ekspresją CT-mRNA w określonych neuronach serotonergicznym, które odgrywają zasadniczą rolę w mechanizmie regulacji reakcji bólowej. Wskazuje to na możliwy udział transmisji serotonergicznym w analgetycznym działaniu kalcytoniny [55]. Wykazano również, że kalcytonina wywołuje szereg innych efektów, między innymi hamuje łaknienie i pragnienie, obniża aktywność motoryczną indukowaną amfetaminą oraz zmniejsza wydzielanie kwasu żołądkowego [56].

Stwierdzono ponadto, że tkanka gruczołu piersiowego, szczególnie w okresie ciąży, jest zdolna do syntezy kalcytoniny i jej receptora, co zostało potwierdzone przy użyciu metody radioimmunologicznej (RIA) oraz PCR [87]. Zarówno u ludzi, jak i u szczura odnotowano wyższe stężenie kalcytoniny w osoczu oraz w gruczole piersiowym w okresie ciąży, które ulega dość gwałtownemu obniżeniu tuż po porodzie, co jest prawdopodobnie wynikiem wpływu progesteronu na sekrecję kalcytoniny. Obecność niewielkich ilości CT oraz CT-mRNA stwierdzono również w gruczole piersiowym

nieciążarnych samic. Ekspresję receptora kalcytoninowego udokumentowano ponadto w nowotworowo zmienionych komórkach gruczołu piersiowego [65,87]. W hodowlach tych komórek CT wywołuje zmiany proliferacyjne. Koekspresja kalcytoniny oraz jej receptora w gruczole piersiowym podczas ciąży sugeruje, że CT odgrywa rolę parakrynną, podobnie jak w innych tkankach [87]. W endometrium synteza kalcytoniny zwiększa się w okresie przedimplantacyjnym zarodka, osiągając szczyt w momencie zagnieżdżenia, a następnie stopniowo ulega obniżeniu [17,19]. Poza endometrium CT syntetyzowana jest również w nabłonku gruczołowym prostaty, w trzustce, w nabłonku gruczołowym jelit i w tkance płucnej [25,39,51,76,80]. Obecność receptorów CT stwierdzono także w podwzgórzu oraz na komórkach laktotropowych przedniego płata przysadki [81]. Kalcytonina wywiera hamujący wpływ na podstawowe oraz stymulowane przez TRH uwalnianie prolaktyny, potwierdzając swoje znaczenie jako jednego z wielu czynników hamujących laktację [55].

Przewlekła ekspozycja receptorów na kalcytoninę jest przyczyną utraty jej wpływu na osteoklasty [37]. Desensytyzacja homologiczna jest następstwem zarówno internalizacji kompleksu hormon - receptor, jak i zahamowania syntezy receptora *de novo*. Udowodniono na przykładzie mysich, osteoklastopodobnych komórek poddawanych długotrwałemu działaniu kalcytoniny, że glikokortykosteroidy zwiększają syntezę CTR-mRNA, przyczyniając się do wzrostu obniżonej wcześniej reaktywności komórek. Badania doświadczalne dowiodły potencjalny wpływ glikokortykosteroidów na działanie kalcytoniny, co również znalazło odbicie kliniczne [91].

W pracy podjęto próbę zebrania zbiorczych informacji na temat aktualnego stanu wiedzy odnośnie komórek okołopęcherzykowych C, istotnej, poza komórkami pęcherzykowymi, i nie do końca jeszcze poznanej strukturalnej składowej gruczołu tarczycowego. Wykazano złożoność procesów wewnątrz- i pozakomórkowych związanych z komórkami C, mających wpływ na czynność tarczycy oraz na zachowanie homeostazy całego organizmu w stanach fizjologicznych i patologicznych. Podkreślono istotną rolę narządową komórek C, wskazując na ich funkcję auto-, para- i endokrynną, zwracając szczególną uwagę na postreceptorową transmisję sygnału indukowanego przez kalcytoninę. Przedstawiono również szereg nowych doniesień na temat kooperacji wewnątrz-tarczycowej między komórkami C i F oraz związanych z ekspresją receptorów błonowych i cytoplazmatycznych komórek C. Dodatkowo wskazano na implikacje kliniczne i możliwości praktycznego zastosowania kalcytoniny w różnych stanach patologicznych.

LITERATURA

- [1] ADAMS S, BAUM RP, HERTEL A, SCHUMM-DRAEGER PM, USADEL KH, HÖR G. Comparison of metabolic and receptor imaging in recurrent medullary thyroid carcinoma with histopathological findings. *Eur J Nucl Med* 1998; **25**: 1277-1283.
- [2] ALBRANDT K, BRADY EMG, MOORE CX, MULI E, SIERZEG AMF, BEAUMONT K. Molecular cloning and functional expression of third isoform of the human calcitonin receptor and partial characterization of the calcitonin receptor gene. *Endocrinology* 1995; **136**: 5377-5384.

- [3] ALUMETS J, HAKANSON R, LUNDQVIST G, SUNDLER F, THORELL J. Ontogeny and ultrastructure of somatostatin and calcitonin cells in the thyroid gland of the rat. *Cell Tissue Res* 1980; **206**: 193–201.
- [4] ARBOGAST LA, SHAH GV, VOOGT JL. 3,5 cyclic adenosine monophosphate mediates the salmon calcitonin-induced increase in hypothalamic tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology* 1999; **140**: 3273–3281.
- [5] ARSLAN N, ILGAN S, YUKSEL D, SERDENGECTI M, BULAKBASI N, UGUR O, OZGUVEN MA. Comparison of in-111 octreotide and tc-99m(v) dmsa scintigraphy in the detection of medullary thyroid tumor foci in patients with elevated levels of tumor markers after surgery. *Clin Nucl Med* 2001; **26**: 683–688.
- [6] AZRIA M, COPP D, ZANNELLI J. 25years of salmon calcitonin: from synthesis to therapeutic use. *Calcif Tissue Int* 1995; **57**: 405–408.
- [7] AZZADIN A, KASACKA I, SAWICKI B, DADAN J, MALLA H, BUCZKO W. Preliminary evaluation of thyroid C cells in rats with chronic renal failure. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 203–204.
- [8] BARASCH JM, MACKAY H, TAMIR H, NUNEZ EA, GERSHON MD. Induction of a neural phenotype in a serotonergic endocrine cell derived from the neural crest. *J Neurosci* 1987; **7**: 2874–2883..
- [9] BOJUNGA J, DRAGAN C, SCHUMM-DRAEGER PM, USADEL KH, KUSTERER K. Circulating calcitonin and carcinoembryonic antigen m-RNA detected by RT-PCR as tumour markers in medullary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 2001; **85**: 1546–1550.
- [10] CARNEY SL. Acute effect of endogenous calcitonin on rat renal function. *Miner Electrolyte Metab* 1995; **21**: 411–416.
- [11] CHABRE O, CONKLIN BR, LIN H, LODISH HY, WILSON E, IVES HE, CATANZARITI L, HEMMINGS BA, BOURNE HR. A recombinant calcitonin receptor independently stimulates 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and Ca²⁺ / inositol phosphatase signaling pathways. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 551–558.
- [12] CHEN WC, WU HC, LU HF, CHEN HY, TSAI FJ. Calcitonin receptor gene polymorphism: a possible genetic marker for patients with calcium oxalate stones. *Eur Urol* 2001; **39**: 716–719.
- [13] CHEN Y, SHYU JF, SANTHANAGOPAL A, INOUE D, DAVID JP, DIXON SJ, HORNE WC, BARON R. The calcitonin receptor stimulates Shc tyrosine phosphorylation and Erk1/2 activation. *J Biol Chem* 1998; **273**: 19809–19816.
- [14] CLARK MS, LANIGAN TM, PAGE NM, RUSSO AF. Induction of a serotonergic and neuronal phenotype in thyroid C cells. *J Neurosci* 1995; **15**: 6167–6178.
- [15] COHEN R, CAMPOS JM, SALAUN C, HESHMATI HM, KRAIMPS JL, PROYE C, SARFATI E, HENRY JF, NICCOLI-SIRE P, MODIGLIANI E. Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and postoperative calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 919–922.
- [16] CORSELLO SM, LOVICU RM, MIGNECO MG, RUFINI V, SUMMARIA V. Diagnostic approach, genetic screening and prognostic factors of medullary thyroid carcinoma. *Rays* 2000; **25**: 257–266.
- [17] CULLINAN-BOVE K, POLIHRONIS M, BAGCHI IC. Coordinate expression of calcitonin and its receptor in the rat uterus during implantation. *Program of the 10th International Congress on Endocrinology, San Francisco, CA* 1996: 844.
- [18] DADAN J, SAWICKI B, CHYZEWSKI L, AZZADIN A, MALLA H, DZIECIOL J, PUCHALSKI Z. Preliminary immunohistochemical investigations of human thyroid C cells in the simple and hyperactive nodular goitre. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 189–190.
- [19] DING YQ, ZHU LJ, BAGCHI IC, BAGCHI MK. Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology* 1994; **135**: 2265–2274.
- [20] ENGELBACH M, HEERDT S, GÖRGES R, KUNT T, PFÜTZNER A, FORST T, DIEFENBACH K, WALGENBACH S, BEYER J. Is there an ectopic secretion of monomeric calcitonin in the human being. *Langenbeck's Arch Surg* 1998; **383**: 456–459.
- [21] EVDOKIOU A, RAGGATT LJ, SAKAI T, FINDLAY DM. Identification of a novel calcitonin-response element in the promoter of the human p21WAF1/CIP1 gene. *J Mol Endocrinol* 2000; **25**: 195–206.
- [22] FERNANDEZ-SANTOS JM, UTRILLA JC, CONDE E, HEVIA A, LODA M, MARTIN-LACAVE I. Decrease in calcitonin and parathyroid hormone mRNA levels and hormone secretion under long-term hypervitaminosis D3 in rats. *Histol Histopathol* 2001; **16**: 407–414.

- [23] FLORIO T, ARENA S, THELLUNG S, IULIANO R, CORSARO A, MASSA A, PATTAROZZI A, BAJETTO A, TRAPASSO F, FUSCO A, SCHETTINI G. The activation of phos-phototyrosine phosphatase h (r-PTPh) is responsible for the somatostatin inhibition of PC C13 thyroid cell proliferation. *Mol Endocrinol* 2001; **15**: 1838–1852.
- [24] GARRETT JE, TAMIR H, KIFOR O, RACHEL T, SIMIN RT, ROGERS KV, MINTHAL A., GAGEL RF, BROWN EM. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* 1995; **136**: 5202–5211.
- [25] GHNASSIA JP, LINDNER V, SCHNEEGANS O, HAEGELE P. Hypercalcitoninemia, nodular goiter, and pancreatic tumor. *Thyroid* 1999; **9**: 599–600.
- [26] GISCARD-DARTEVELLE S, GHILLANI P, TABOULET J, TROALEN F, SEGOND N, LASMOLES F. Specific Immunostaining for CCP II, a novel calcitonin carboxyl terminal peptide encoded by calcitonin/CGRP gene. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 1605–1610.
- [27] GKONOS PJ, TAVIANINI MA, LIU CC, ROSS BA. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in normal thyroid parafollicular cells. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 2101–2109.
- [28] GORN A, RUDOLPH SM, FLANNERY MR, MORTON CC, WEREMOWICZ S, WANG JT, KRANE SM, GOLDRING SR. Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2680–2691.
- [29] GUIGNAT L, BIDART JM, COMOY E, SCHLUMBERGER M, BAUDIN E. Chromogranin A and the α -subunit of glycoprotein hormones in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. *Br J Cancer* 2001; **84**: 808–812.
- [30] GUYETANT S, ROUSSELET MC, DURIGON M, CHAPPARD D, FRANC B, GUERIN O, SAINT-ANDRE JP. Sex-related C cell hyperplasia in the normal human Thyroid: a quantitative autopsy study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 42–47.
- [31] HAHM JR, LEE MS, MIN YK, LEE MK, KIM KW, NAM SJ, YANG JH, CHUNG JH. Routine measurement of serum calcitonin is useful for early detection of medullary thyroid carcinoma in patients with nodular thyroid diseases. *Thyroid* 2001; **11**: 73–80.
- [32] HANNA FW, ARDILL JE, JOHNSTON CF, CUNNINGHAM RT, CURRY WJ, RUSSELL CF, BUCHANAN KD. Regulatory peptides and other neuroendocrine markers in medullary carcinoma of the thyroid. *J Endocrinol* 1997; **152**: 275–281.
- [33] HOCEVAR M, BERGANT D, AUERSPERG M, GOLOUH R. Medullary carcinoma of the thyroid with serotonin production and carcinoid-like syndrom. *Eur J Surg Oncol* 2001; **27**: 219–222.
- [34] HOFF A, THOMAS P, COTE C, et al. Generation of a calcitonin knockout mouse model. *Bone* 1998; **23**: 164.
- [35] HOUSSAMI S, FINDLAY DM, BRADY CL, MYERS DE, MARTIN TJ, SEXTON PM. Isoforms of rat calcitonin receptor: Consequences for ligand binding and signal trasduction. *Edocrinology* 1994; **135**: 183–190.
- [36] HURWITZ S. Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; **31**: 41–100.
- [37] INOUE D, SHIH C, GALSON DL, GOLDRING SR, HORNE WC, BARON R. Calcitonin-dependent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinology* 1999; **140**: 1060–1068.
- [38] KANAMOTO N, AKAMIZU T, HOSODA H, HATAYA Y, ARIYASU H, TAKAYA K, HOSODA K, SAJO M, MORIYAMA K, SHIMATSU A, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 984–990.
- [39] KASACKA I, AZZADIN A, SAWICKI B, MALLA H. Immunoreactivity of neuroendocrine cells in the respiratory tract in rats with experimental uremia after thyroparathyroidectomy. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 64–65.
- [40] KOMMINOTH P, ROTH J, SAREMASLANI P, MATIAS-GUIU X, WOLFE HJ, HEITZ PU. Polysialic acid the neural cell adhesion molecule in the human thyroid: a marker for medullary thyroid carcinoma and primary C-cell hyperplasia. *Am J Sur Pathol* 1994; **18**: 399–470.
- [41] KOTZMANN H, SCHMIDT A, SCHEUBA C, KASERER K, WATSCHINGER B, SOREGI G, NIEDERLE B, VIERHAPPER H. Basal calcitonin levels and the respons to pentagastrin stimulation in patients after kidney transplantatin or on chronic hemodialysis as indicators of medullary carcinoma. *Thyroid* 1999; **9**: 943–947.

- [42] KRAUSZ Y, ROSLER A, GUTTMANN H, ISH-SHALOM S, SHIBLEY N, CHISIN R, GLASER B. Somatostatin receptor scintigraphy for early detection of regional and metastases of medullary carcinoma of the thyroid. *Clin Nucl Med* 1999; **24**: 256–260.
- [43] KUWAMURA M, SHIROTA A, YAMATE J, KOTANI T, OHASHI F, SAKUMA S. C-cell adenoma containing variously sized thyroid follicles in a horse. *J Vet Med Sci* 1998; **60**: 387–389.
- [44] LAVIGNE JR, ZAHRADNIK RJ, CONKLIN RL, LAMBERT LD, LOGAN MA, PARIHAR A, FOX J. Stimulation of calcitonin secretion by calcium receptor activators: evaluation using a new, highly sensitive, homologous immunoradiometric assay for rat calcitonin. *Endocrine* 1998; **9**: 293–301.
- [45] LEROYER-ALIZON E, DAVID L, DUBOIS PM. Evidence for calcitonin in the thyroid gland of normal and an encephalic human fetuses: immunocytological localization, radioimmunoassay and gel filtration of thyroid extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; **50**: 316–321..
- [46] LIU K, HSIUNG S, ADLERSBERG M, SACKTOR T, GERSHON MD, TAMIR H. Ca²⁺-evoked serotonin secretion by parafollicular cells: roles in signal transduction of phosphatidylinositol 3'-kinase, and the gamma and zeta isoforms of protein kinase C. *J Neurosci* 2000; **15**: 1365–1373.
- [47] LU CC, TSAI SC, HUANG WJS, TSAI CL, WANG PS. Effects of hyperprolactinemia on calcitonin secretion in male rats. *Metabolism* 1999; **48**: 221–226.
- [48] LUKACS G, SAPY Z, GYORY F, TOTH V, BALAZS G. Distribution of calcitonin-containing parafollicular cells of the thyroid in patients with chronic lymphocytic thyroiditis: a clinical, pathological and immunohistochemical study. *Acta Chir Hung* 1997; **36**: 204–206.
- [49] MATO E, MATIAS-GUIU X, CHICO A, WEBB SM, CABEZAS R, BERNA L, DE LEIVA A. Somatostatin and somatostatin receptor subtype gene expression in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2417–2420.
- [50] MIRZAEI S, KROTLA G, KNOLL P, KORISKA K, KOHN H. Possible effect of calcitonin deficiency on bone mass after subtotal thyroidectomy. *Acta Med Austriaca* 1999; **26**: 29–31
- [51] MONSIEUR I, MEYSMAN M, NOPPEN M, DE GREVE J, DELHOVE O, VELCKENIERS B, JACOBVITZ D, VINCKEN W. Non-small-cell lung cancer with multiple paraneoplastic syndromes. *Eur Respir J* 1995; **8**: 1231–1234
- [52] MOORE EE, KUESTNER RE, THOMPSON DL, KUIJPER J, THASTRUP O, MATHEWES S.L, GRANT FT, ELROD R, STROOP S, SMITH B, SHEPPARD P, HAGEN F. The cloned human calcitonin receptor can couple to two alternative second messenger pathways when in BHK cells. *J Bone Miner Res* 1992; **7**: 146
- [53] MURAYAMA A, TAKEYAMA K, KITANAKA S, KODERA Y, KAWAGUCHI Y, HOSOYA T, KATO S. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin and 1 alpha,25(OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology* 1999; **140**: 2224–2231.
- [54] NACAMURA M, YANG Q, GOUDA T, TAKEHARA A, OHTA H, MIYAJIMA M, KAKUDO K. Loss of calcitonin binding in rat is not related to calcitonin receptor gene abnormality. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **284**: 1184–1188.
- [55] NAKAMOTO H, SOEDA Y, TAKAMI S, MINAMI M, SATOH M. Localization of calcitonin receptor mRNA in the mouse brain: coexistence with serotonin transporter mRNA. *Mol Brain Res* 2000; **76**: 93–102.
- [56] NAKAMURA M, MORIMOTO S, ZHANG Z, UTSUNOMIYA H, INAGAMI T, OGIHARA T, KAKUDO K. Calcitonin receptor gene polymorphism in Japanese women: correlation with body mass and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2001; **68**: 211–215.
- [57] NARO F, PEREZ M, MIGLIACCIO S, GALSON DL, ORCEL P, TETI A, GOLDRING SR. Phospholipase D- and protein kinase C isoenzyme-dependent signal transduction pathways activated by the calcitonin receptor. *Endocrinology* 1998; **139**: 3241–3248.
- [58] NAVEH-MANY T, RAUE F, GRAUER A, SILVER J. Regulation of calcitonin gene expression by hypocalcemia, and vitamin D in the rat. *J Bone Miner Res* 1992; **7**: 1233–1237.
- [59] NISHIYAMA I, OGISO M., OOTA T, KIMURA T, SEKI T. Developmental change in expression of highly polysialated neural cell adhesion molecule in C-cells in rat thyroid gland. *Anat Embryol (Berl)* 1996; **194**: 419–426.
- [60] PAMARTHI MF, RUDD MA, BUKOSKI RD. Normal perivascular sensory dilator nerve function in arteries of Zucker diabetic fatty rats. *Am J Hypertens* 2002; **15**: 310–315.

- [61] PEARSE AGE. Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin. *Proc Roy Soc London B*. 1968; **170**: 71–80.
- [62] PEARSE AGE. The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc. Roy. Soc. London B*. 1966; **164**: 478–487.
- [63] PENTO JT, HURT GM, RAJAH T. Evaluation of calcium-mediated secretion from the isolated perfused porcine thyroid using secretory inhibitors. *Horm Metab Res* 1995; **27**: 107–109
- [64] PONDEL M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Pathol* 2000; **81**: 405–422.
- [65] RAGGATT LJ, EVDOKIOU A, FINDLAY DM. Sustained activation of Erk 1/2 MAPK and cell growth suppression by the insert-negative, but not the insert-positive isoform of the human calcitonin receptor. *J Endocrinol* 2000; **167**: 93–105.
- [66] REDDING AH, LEVINE SN, FOWLER MR. Normal preoperative calcitonin levels do not always exclude medullary thyroid carcinoma in patients with large palpable thyroid masses. *Thyroid* 2000; **10**: 919–922.
- [67] RINK T, FITZ H, SCHROTH HJ, BRAUN S. Development of the parafollicular cells in recurrent goiter. *Eur J Endocrinol* 2001; **144**: 485–489.
- [68] RONG H, JI H, TSAI JA, PERNOW Y, BUCHT E. Calcitonin-suppressed expression of parathyroid hormone-related protein in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **265**: 260–264.
- [69] SANTHANAGOPAL A, CHIDIAC P, HORNE WC, BARON R, DIXON J. Calcitonin (CT) rapidly increases Na^+/H^+ exchange and metabolic acid production: effects mediated selectively by the C1a CT receptor isoform. *Endocrinology* 2001; **142**: 4401–4413.
- [70] SAWICKI B. Komórki parafolikularne (C) tarczycy u wybranych gatunków ssaków. *Praca habilitacyjna* 1999, Białystok: 1–90.
- [71] SAWICKI B, CZYKIER E, KASACKA I, KASPRZAK A, ZABEL M. Hybridocytochemical detection of mRNA for calcitonin, CGRP, NPY and somatostatin in thyroid parafollicular (C) cells in three rodent species. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; **40**: 89–90.
- [72] SAWICKI B. Wytwarzanie peptydów regulacyjnych w komórkach parafolikularnych (C) tarczycy. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 395–407.
- [73] SCHERUBL H, KLEPPISCH T, ZINK A, RAUE F, KRAUTWURST D, HESCHELER J. Major role of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} -channels in Ca^{2+} -induced calcitonin secretion. *Am J Physiol* 1993; **264**: 354–360.
- [74] SCHEUBA C, KASERER K, KOTZMANN H, BIEGLMAYER C, NIEDERLE B, VIERHAPPER H. Prevalence of C-cell hyperplasia in patients with normal basal and pentagastrin-stimulated calcitonin. *Thyroid* 2000; **10**: 413–416.
- [75] SCHMID I, STACHEL D, SCHON C, BAUER M, HAAS RJ. Pamidronate and calcitonin as therapy of acute cancer-related hypercalcemia in children. *Klinische Padiatrie* 2001; **213**: 30–34.
- [76] SEGAWA N, NAKAMURA M, NAKAMURA Y, MORI I, KATSUOKA Y, KAKUDO K. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is inhibited by calcitonin in DU145 prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 6060–6063.
- [77] SEIDEL J, ZABEL M, KASPRZAK A. Studies on cultured cells of thyroid medullary carcinoma with the use of immunocytochemical techniques. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 63–64.
- [78] SEKULIC M, LOVREN M, MILOSEVIC V, MICIC M, BALINT PERIC L. Thyroid C cells of middle-aged rats treated with estradiol or calcium. *Histochem Cell Biol* 1998; **109**: 257–262.
- [79] SEXTON P, FINDLAY D, MARTIN T. Calcitonin. *Curr Med Chem* 1999; **6**: 1067–1093.
- [80] SHAH GV, REYFORD W, NOBLE MJ, AUSTENFELD M, WEIGEL J, VAMOS S, MEBUST WK. Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3', 5' -monophosphates and cytoplasmic Ca^{2+} transients. *Endocrinology* 1994; **134**: 596–602.
- [81] SHAH GV, WANG W, GROSVENOR CE, CROWLEY WR. Calcitonin inhibits basal and thyrotropin-releasing hormone-induced release of prolactin from anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1990; **127**: 621–628.
- [82] SHINKI T, UENO Y, DELUCA HF, SUDA T. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8253–8258.

- [83] SIGA E, HOUILLIER P, MANDON B, MOINE G, DE ROUFFIGNAC C. Calcitonin stimulates H⁺ secretion in rat kidney intercalated cells. *Am J Physiol* 1996; **271**: 1217–1223
- [84] SILVER J, NAVEH-MANY T. Calcitonin gene regulation *in vivo*. *Horm Metab Res* 1993; **25**: 470–472.
- [85] SLOOTER GD, MEARADJI A, BREEMAN WAP, MARQUET RL, DE JONG M, KRENNING EP, VAN EIJC CHJ. Somatostatin receptor imaging, therapy and new strategies in patients with neuroendocrine tumors. *Br J Surg* 2001; **88**: 31–40.
- [86] SUZUKI H, NAKAMURA I, TAKAHASHI N, IKUHARA T, MATSUZAKI K, ISOGAI Y, HORI M, SUDA T. Calcitonin-induced changes in the cytoskeleton are mediated by a signal pathway associated with protein kinase A in osteoclasts. *Endocrinology* 1996; **137**: 4685–4690.
- [87] TVERBERG LA, GUSTAFSON MF, SCOTT TL, ARZUMANOVA IV, PROVOST E. R., YAN A. W., RAWIE S. A. Induction of calcitonin and calcitonin receptor expression in rat mammary tissue during pregnancy. *Endocrinology* 2000; **141**: 3696–3702.
- [88] USENKO VS, GERBILSKY LV, KORNILOVSKAJA IN. The epitheliomeral concept of the thyroid gland's structural organization. *Anat Rec* 1996; **244**: 214–224.
- [89] UWAIFO GI, REMALEY AT, STENE M, REYNOLDS JC, YEN PM, SNIDER RH, BECKER KL, SABLIS NJ. A case of spurious hypercalcitoninemia: A cautionary tale on the use of plasma calcitonin assays in the screening of patients with thyroid nodules for neoplasia. *J Endocrinol Invest* 2001; **24**: 361–369.
- [90] VITALE G, CARAGLIA M, CICCARELLI A, LUPOLI G, ABBRUZZESE A, TAGLIAFERRI P, LUPOLI G. Current approaches and perspectives in the therapy of medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 2001; **91**: 1797–1808.
- [91] WADA S, YASUDA S, NAGAI T, MAEDA T, KITAHAMA S, SUDA S, FINDLAY DM, IITAKA M, KATAYAMA S. Regulation of calcitonin receptor by glucocorticoid in human osteoclast-like cells prepared *in vitro* using receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and macrophage colony-stimulating factor. *Endocrinology* 2001; **142**: 1471–1478.
- [92] WELLS S.A, FRANZ C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. *World J Surg* 2000; **24**: 952–956.
- [93] YOSHIDA N, YOSHIDA T, NAKAMURA A, MONKAWA T, HAYASHI M, SARUTA T. Calcitonin induced 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase mRNA expression via protein kinase C pathway in LLC-PK1 cells. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 2474–2479.
- [94] ZABEL M, DIETEL M, GĘBAROWSKA E, MICHAEL R. Effect of follicular cells on calcitonin gene expression in thyroid parafollicular cells in cell culture. *Histochem J* 1999; **31**: 175–180.
- [95] ZABEL M, GĘBAROWSKA E, KASPRZAK A. Control of calcitonin gene expression in thyroid parafollicular cells co-cultured with thyroid follicular cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 61–62.
- [96] ZABEL M. Regulation of calcitonin secretion by thyroid parafollicular cells *in vitro*. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; **33**: 193–196.
- [97] ZABEL M. Ultrastructural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of rat thyroid. *Histochem J* 1984a; **16**: 1265–1272..
- [98] ZATELLI MC, TAGLIATI F, TAYLOR JE, ROSSIR, CULLER MD, DEGLI UBERTI EC. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 differentially affect proliferation *in vitro* of human medullary thyroid carcinoma cell line TT *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 2161–2169.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 07.09. 2002 r.

Przyjęto: 09.10.2002 r.

ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok

e-mail: klchirog@amb.ac.bialystok.pl

BIAŁKA TRF1/TRF2 ORAZ TANK1/TANK2 I ICH UDZIAŁ W REGULACJI DŁUGOŚCI TELOMERÓW

THE TRF1/TRF2 AND THE TANK1/TANK2 PROTEINS
AND THEIR ROLE IN THE TELOMERES LENGTH REGULATION

Katarzyna SKÓRZYŃSKA, Joanna KOLANO, Janusz KOCKI,
Jacek WOJCIEROWSKI

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie: Telomery są końcowymi fragmentami chromosomów, m.in. chroniącymi je przed niewłaściwymi mechanizmami naprawy DNA. Długość telomerów jest regulowana przez działanie wielu różnych białek: TRF1, TRF2, TIN2, TANK1, TANK2. Białka TRF1 i TRF2 są zaangażowane w tworzenie szczególnych struktur, zwanych pętlami t, które chronią telomery przed fuzjami „koniec do końca”. TANK1 i TANK2 należą do klasy białek PARP. Białka te regulują funkcję telomerów przez poli-ADP-rybozylację. Z powodu systematycznej utraty powtórzeń telomerowych podczas podziałów komórek, telomeraza i towarzyszące białka są niezbędne do utrzymania stabilności genomu. Interakcje pomiędzy wszystkimi tymi czynnikami są bardzo złożone i wciąż niedostatecznie poznane.

Słowa kluczowe: telomery, telomeraza, TRF1, TRF2, TIN2, PARP, TANK1, TANK2.

Summary: Telomeres are the end fragments of the chromosomes, protecting them from inappropriate DNA repair mechanisms. The length of telomeres is regulated by interactions of a number of different proteins: TRF1, TRF2, TIN2, TANK1, TANK2. TRF1 and TRF2 proteins are involved in forming specific structures called t-loops, which protect telomeres from end-to-end fusions. TANK1 and TANK2, belonging to a class of proteins called PARPs, regulate telomere function by poly(ADP-ribosyl)ation. Because of systematic loss of telomeric repeats during cell divisions, telomerase and associated proteins are necessary to maintain genomic stability. Interactions between all this factors are very complex and still poorly known.

Key words: telomeres, telomerase, TRF1, TRF2, TIN2, PARPs, TANK1, TANK2.

Wykaz stosowanych skrótów: **kpz** – tysiący par zasad; **hTR** (*human Telomerase RNA Component*) – podjednostka RNA ludzkiej telomerazy; **hTERT** (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) – podjednostka katalityczna o aktywności odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy; **hTEP1** (*human Telomerase Associated Protein 1*) – białko stowarzyszone z ludzką telomerazą; **TRF1, TRF2** (*TTAGGG Repeat Binding Factor 1 and 2*) – czynniki wiążące sekwencje TTAGGG; **TRFH1, TRFH2** (*TRF Homology*) – domeny homologii TRF; **TIN2** (*TRF1 Interacting Nuclear Protein*) – jądrowe białko

oddziałujące z TRF1; **PARP** (*Poly ADP-Ribose Polymerase*) – polimeraza poli-ADP rybozylowa; **TANK1**, **TANK2** (*TRF1 Associated Poly ADP-Ribose Polymerase 1 and 2*) – polimerazy poli-ADP rybozylowe stowarzyszone z TRF1.

TELOMERY I TELOMERAZA

Telomery, będące końcowymi fragmentami chromosomów, są strukturami niezbędnymi do utrzymania integralności genomu *Eukariota*. Redukcja ich długości, do której dochodzi podczas podziałów w większości komórek, jest określana mianem „zegara proliferacji” [49]. Od różnorodnych mechanizmów regulacji długości telomerów zależą dalsze losy komórki: starzenie się, śmierć lub nieśmiertelność.

Do niedawna sądzono, że genom *Prokariota* zawsze zbudowany jest z kolistej cząsteczki dwuniciowego DNA. Obecnie wiadomo, że część *Prokariota* (np. *Borrelia burgdorferi*, *Streptomyces* sp.) ma podobnie jak wszystkie *Eukariota* liniowe chromosomy [54]. Organizmy o takiej strukturze genomu potrzebują ochrony końców chromosomów przed mechanizmami naprawczymi, które mogłyby mylnie uznać je za złamanie DNA. Struktura telomerów pełni więc funkcję „maskującą” chroniącą przed nukleazami. Stanowią one także „strefę buforową” w czasie replikacji, która jest niekompletna z uwagi na niemożność dołączenia końcowego startera do nici opóźnionej, wskutek czego komórka traci fragment sekwencji powtarzalnej. Geny znajdujące się w sąsiedztwie telomerów są często upakowane w trudno dostępne struktury, co jest przyczyną epigenetycznego hamowania ich transkrypcji, określanego jako efekt wyciszania telomerowego (tzw. pozycyjny efekt telomerowy) [15]. Telomery biorą również udział w terminacji replikacji chromosomowego DNA. W czasie podziałów komórkowych biorą udział w rozpoznawaniu chromosomów homologicznych [35]. Defekty telomerów lub białek z nimi związanych mogą zaburzyć segregację chromosomów podczas mitozy [9, 19].

Budowa telomerów różni się nieznacznie u poszczególnych gatunków. U strunowców zbudowane są one z powtórzeń sekwencji 5'-TTAGGG-3' [4, 28]. Prawie na całej swej długości mają strukturę dwuniciową, ale można zauważyć, że nić 3' (bogata w guaninę) jest dłuższa od nici 5' (bogatej w cytozynę) o 150 nukleotydów i tworzy tzw. protruzję, czyli wystawanie nici 3' (ang. „3' protrusion”, „G overhang”) [28, 30, 52]. Taka budowa umożliwia oddziaływanie z różnymi czynnikami regulatorowymi, w tym z telomerazą przyłączającą się wyłącznie do wolnej nici 3'. Protruzja nici G jest cechą wszystkich eukariotycznych telomerów [48].

Ilość powtórzeń sekwencji TTAGGG jest charakterystyczna dla gatunku. U człowieka waha się od 2–30 tys. par zasad [14, 18]: komórki młodsze mają dłuższe, a starsze krótsze telomery (odpowiednio 15–30 tys. par zasad i 2–10 tys. par zasad). Przy każdym podziale komórki tracą średnio po 50–200 par zasad, ale wielkość tych strat jest uzależniona od wieku komórki – w pierwszych latach życia obserwuje się skrócenie telomerów o 30% [20, 36], w kolejnych latach proces ten ulega spowolnieniu.

Przyjmuje się, że stałe skracanie sekwencji telomerowych determinuje długość życia komórki. W przypadku komórek unieśmiertelnionych (w tym komórek nowotworowych) o losach komórki decyduje nie tyle długość telomerów, co jej stabilizacja (dynamika utraty sekwencji telomerowych ulega zakłóceniu). Ilość powtórzeń TTAGGG jest wtedy charakterystyczna dla danej linii komórkowej.

Utrata funkcji telomerów w ludzkich komórkach prowadzi do tworzenia chromosomów dicentrycznych i innych nieprawidłowości wynikających z łączenia się końców chromosomów [11, 19]. W czasie podziałów prawidłowych komórek telomery ulegają skracaniu wskutek braku aktywności telomerazy, która jest odpowiedzialna za odbudowę końców chromosomów. Mechanizm działania telomerazy, białka o aktywności odwrotnej transkryptazy, wykorzystującej fragment zawartego w niej RNA jako matrycę do syntezy powtórzeń telomerowych rozwiązuje problem replikacji końców chromosomów.

U człowieka aktywna telomeraza zbudowana jest z co najmniej trzech podjednostek: podjednostki RNA (hTR), podjednostki katalitycznej (hTERT) oraz białka związanego z telomerazą (hTEP1) [33, 46].

Podjednostka RNA, stanowiąca własną matrycę RNA do wydłużania końca 3' jednoniciowego fragmentu telomeru jest transkryptem II polimerazy RNA. Gen kodujący podjednostkę hTR znajduje się w dłuższym ramieniu chromosomu 3. Długość dojrzałego transkrypty hTR wynosi około 450 nukleotydów, natomiast obszar matrycowy o sekwencji 5'-CUAACCCUAAC-3' obejmuje 11 nukleotydów [6].

Podjednostka katalityczna tworzy nową klasę odwrotnych transkryptaz o odmiennej strukturze i pochodzeniu retrowirusowym. Gen kodujący podjednostkę hTERT znajduje się w krótszym ramieniu chromosomu 5. Składa się z 16 eksonów i 15 intronów o łącznej długości około 35 tys. par zasad. Podjednostka katalityczna zbudowana jest z tzw. domeny T i siedmiu sekwencji konserwatywnych do innych odwrotnych transkryptaz [33].

Białko hTEP1, identyczne z podjednostką o masie 240 tysięcy daltonów, należąca do dużego kompleksu rybonukleoproteinowego o nieznannej funkcji, jest homologiem białka o masie 80 tysięcy daltonów, występującego u orzęsków [33].

Aktywność telomerazy stwierdza się w warunkach prawidłowych w komórkach zarodkowych oraz niektórych somatycznych o dużym potencjale proliferacyjnym (komórki macierzyste szpiku, obwodowe komórki macierzyste, komórki warstwy rozrodczej nabłonka krypt jelitowych, komórki warstwy podstawnej skóry, keratynocyty, limfocyty). W czasie wzrostu aktywności limfocytów T i B *in vitro* oraz podczas różnicowania prekursorów limfocytów B w limfocyty B centrów rozrodczych aktywność telomerazy wzrasta nawet tysiąc razy [31]. Stwierdzono, że aktywność telomerazy w komórkach hematopoetycznych obniża tempo skracania telomerów w czasie proliferacji, ale nie zapobiega całkowicie ich utracie [12].

Aktywność telomerazy wykrywa się w komórkach nieśmiertelnych [21] oraz w 85% nowotworów złośliwych [38], w przeciwieństwie do nowotworów łagodnych nie wykazujących tej aktywności [32]. Telomeraza jest czynna w czasie całego cyklu komórkowego, nie stwierdza się natomiast jej aktywności w komórkach, które wyszły z cyklu [21].

Mechanizmy regulujące aktywność telomerazy nie zostały dotychczas dostatecznie wyjaśnione. Do substancji zwiększających jej aktywność należą m.in. kinaza białkowa C, antygeny aktywujące limfocyty T, estrogeny, zwiększona ekspresja genu *c-myc*, czynnik wzrostu naskórka, promieniowanie γ , chemiczne karcynogeny oraz mutacje w obrębie genu kodującego telomerazę. W regulacji ekspresji genu dla podjednostki katalitycznej telomerazy biorą udział: tlenek azotu, fosforylacja oraz składanie alternatywne pierwotnego transkryptu. Regulatorami pozytywnymi ekspresji genu dla podjednostki hTERT są białko *c-myc* oraz estrogeny, natomiast negatywnymi – metylacja promotora oraz wzrost stężenia wapnia w komórce [33].

Duże znaczenie w regulacji aktywności podjednostki katalitycznej telomerazy ma katalizowana przez rodzinę białek PARP poli-ADP-rybozylacja, która gra również rolę w regulacji aktywności białka TRF1 – negatywnego regulatora długości telomerów.

BIAŁKA TRF1 I TRF2

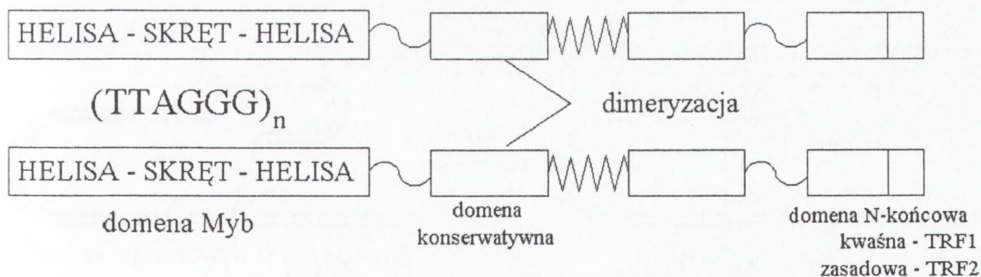
Telomery *in vivo* nie tworzą ściśle liniowej struktury, byłyby bowiem narażone na działanie mechanizmów naprawczych DNA.

U niższych organizmów, takich jak orzęski, telomery o długości mniejszej niż 50 bp są pokryte białkami osłaniającymi ich koniec 3' [22].

W ochronie przed endonukleazami organizmów, mających dłuższe telomery, biorą udział inne czynniki. Do niedawna uważano, że to właśnie specyficzna sekwencja TTAGGG oraz kwartety G pełnią rolę ochronną [50]. Obecnie przyjmuje się, że kluczową rolę w utrzymaniu stabilności telomerów pełnią białka TRF (TTAGGG – ang. *Repeat Binding Factors*) [10, 5]. Oba białka TRF na końcu karboksylowym mają domenę helisa-skreć-helisa, podobną do białka Myb (*Myb-like domain*) i centralną domenę konserwatywną, zawierającą sekwencje umożliwiające tworzenie homodimerów [43].

Domena C-końcowa białka Myb determinuje specyfikę łączenia się z telomerowym DNA. Podobna struktura występuje u drożdży, gdzie DNA telomerowy jest związany z białkiem scRap1p, zaliczanym do I klasy białek Myb, mającym dwie centralne, dodatnio naładowane domeny Myb. Mogą one łączyć się z DNA ujemnie naładowanym. U człowieka homologiem białka scRap1p jest białko hRap1 z jedną domeną Myb. Czynnikiem ten nie ma jednak zdolności bezpośredniego wiązania się z DNA, konieczny jest tu udział białka TRF2. Domena Myb białka hRap1 zbudowana jest z trzech helis oraz hydrofobowego rdzenia. Pozbawiona jest wyraźnie dodatniego potencjału elektrostatycznego powierzchni i to właśnie uniemożliwia bezpośrednie łączenie się z DNA. Białko hRap1 zaliczane jest więc do klasy II białek Myb (razem z *c-MybR1*, *ADA2* oraz *Adf1*). Domeny Myb obu klas białek są do siebie strukturalnie bardzo podobne, ale funkcja każdej z nich zależy jednak od składu aminokwasowego na jej powierzchni [17].

W dimeryzacji TRF1 i TRF2 bierze udział domena homologii TRF, która również odgrywa rolę w interakcjach z innymi białkami telomerowymi. Obie domeny TRFH1



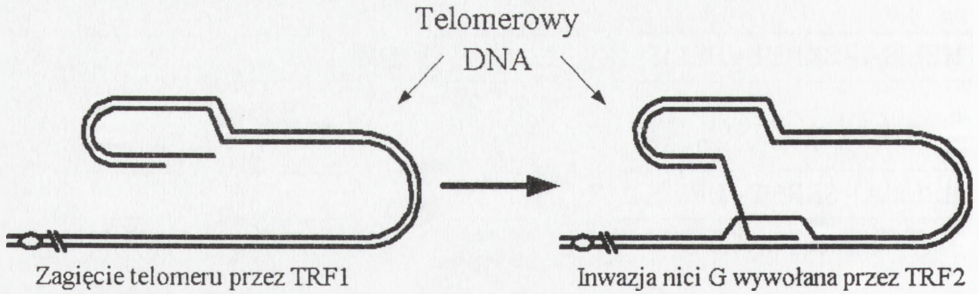
RYCINA 1. Budowa białek TRF1/TRF2

i TRFH2 mają taką samą alfa helikalną strukturę, przypominającą skręconą podkowę. Zapobiega to heterodimeryzacji. Domeny TRFH biorą udział w homodimeryzacji, wiązaniu DNA i lokalizacji telomerów (ryc. 1) [13].

Białka TRF1 i TRF2 różnią się od siebie sekwencją N-końcową, która w TRF1 ma charakter kwaśny, a w TRF2 – zasadowy [7]. Oba białka TRF mają zdolność wiązania *in vitro* DNA telomerowego [43]. W komórkach ludzkich TRF1 i TRF2 są zlokalizowane w pobliżu końców chromosomów, gdzie ochraniają DNA telomerowy. Większość ludzkich chromosomów jest połączona przez cały cykl komórkowy z tymi dwoma czynnikami jednocześnie [10, 8, 42], przy czym aktywność białek TRF wzrasta w telomerach bogatszych w powtórzenia TTAGGG. Białka TRF1 i TRF2 nie wpływają na aktywność telomerazy [43].

Nadmierna ekspresja TRF1 (opisana w linii komórkowej ludzkiego włókniakomięsaka HTC75 wrażliwej na tetracyklinę) spowodowała stopniowe skracanie telomerów z prędkością ok. 10 bp w czasie każdego podziału [44]. Przy zahamowaniu ekspresji TRF1 dochodziło do wydłużenia telomerów [43]. Na podstawie tych doświadczeń opisano TRF1 jako negatywny regulator długości telomerów. Nie może on jednak sam regulować długości telomerów u człowieka, koniecznym mediatorem jest TIN2 (ang. *TRF1 Interacting Nuclear Protein*). Białko to oddziałuje z TRF1 w komórkach oraz *in vitro*. Mutant TIN2, który nie zawiera sekwencji N-końcowych, wydłuża ludzkie telomery w sposób zależny od telomerazy [25].

W przypadku TRF2 nadmierna ekspresja w komórkowej linii HTC75 powodowała początkowo spadek, a potem powrót do wyjściowej długości telomerów [43]. Zahamowanie aktywności TRF2 prowadzi do pojawienia się fuzji chromosomalnych typu koniec do końca, zawierających DNA telomerowy. Wynika z tego, że sama obecność powtórzeń TTAGGG nie gwarantuje stabilności chromosomów, konieczna jest tu obecność TRF2 [44]. Stabilizująca funkcja TRF2 ujawnia się po replikacji i dotyczy tylko połowy telomerów zsyntetyzowanych *de novo*, tzn. tych, które powstały w procesie syntezy nici wiodącej [3]. Czynnikiem ten pełni również rolę ochronną wobec protruzji G. Zahamowanie funkcji TRF2 prowadzi do utraty części tej nici [44], co z kolei wywołuje odpowiedź identyczną z odpowiedzią na uszkodzenie DNA: uruchomienie procesów zależnych od genów ATM i p53, zatrzymanie cyklu komórkowego



RYCINA 2. Powstawanie pętli t

i śmierć komórki w drodze apoptozy [16]. Transfekcja powtórzeń TTAGGG do ludzkich komórek prowadzi do utworzenia pełnowartościowych telomerów *de novo* [14]. Początkowo sądzono, że w procesie naprawy telomerów podstawową rolę odgrywa TRF1 [18], obecnie tę funkcję przypisuje się raczej TRF2 [44].

Griffith i wsp. zaproponowali mechanizm, w jaki białka TRF1 i TRF2 oddziałują z telomerowym DNA. Dimer TRF1 po połączeniu się z dwuniciowym DNA powoduje zagięcie cząsteczki wokół własnej osi. Umożliwia to działanie TRF2, który doprowadza do inwazji nici 3'. Łączy się ona z nicią 5' fragmentu dwuniciowego położonego proksymalnie (wcześniej komplementarna nić tego fragmentu zostaje „odsunięta”, a zastępuje ją właśnie fragment protruzji G). W ten sposób, współdziałając ze sobą, białka TRF1 i TRF2 przyczyniają się do powstania pętli t (ang. *t-loop*), która z jednej strony blokuje dostęp dla telomerazy (protruzja G jest ukryta w pętli), z drugiej nie pozwala na włączenie nieprawidłowych mechanizmów naprawczych DNA, gdyż końcowy fragment chromosomu nie jest już strukturą liniową (ryc. 2) [16]. Pętle t zawierają niemal cały telomerowy DNA, ich rozmiary są więc różne w różnych liniach komórkowych, tak jak zmienna jest w nich ilość powtórzeń TTAGGG. Przepuszczalnie właśnie to krytyczne skrócenie telomerów do długości uniemożliwiającej wytworzenie pętli t powoduje niestabilność genomu [26].

Mechanizmy naprawcze ignorują strukturę pętli t – być może dzięki temu, że przypomina ona widełki replikacyjne. Nić 3' dokonująca inwazji mogłaby być tu uznawana za ekwiwalent końcowego fragmentu syntetyzowanej nici wiodącej, zaś nić 5' za odpowiednik nici opóźnionej. Pętla t może być również otwierana jak widełki replikacyjne, zezwalając na czasowy dostęp telomerazy [16].

RODZINA BIAŁEK PARP

Odrębnym zagadnieniem, rzucającym światło na regulację długości telomerów i interakcje białek w niej uczestniczących, jest mechanizm poli-ADP-rybozylacji. Sugeruje się, że poli-ADP-rybozylacja odgrywa rolę nie tylko w zachowaniu długości

i funkcji telomerów, ale także przez oddziaływanie z wieloma białkami kontrolującymi integralność genomu ma wpływ na współdziałanie między replikacją i naprawą DNA, telomerami a chromatyną.

Za poli-ADP-rybozylację są odpowiedzialne białka PARP, które katalizują włączanie wielu reszt ADP-rybozy i tworzenie łańcuchów ADP-rybozy (niekiedy rozgałęzionych) na specyficznych białkach. Łańcuchy, których długość wynosi od kilkunastu do kilkudziesięciu reszt, są odporne na działanie większości znanych nukleaz, depolimeryzowane natomiast przez pewne fosfodiesterazy i glikohydrolazy. Dawcą reszt ADP-rybozylowych jest NAD. Akceptorem pierwszej grupy ADP-rybozylowej jest atom tlenu w γ -karboksylowej grupie kwasu glutaminowego lub O^β -fosfoseryny modyfikowanych białek [51].

Białka PARP oddziałują niekowalencyjnie z wieloma białkami kontrolującymi integralność genomu. Pleschke i wsp. wykazali istnienie sekwencji wiążącej łańcuchy poli-ADP-rybozy m.in. w białku p53, p21^{CIP1}, MSH₆, ligazie DNA III, DNA-PK_{CS}, Ku 70, NF- κ B oraz w podjednostce katalitycznej telomerazy. Wiążąca sekwencja 20-aminokwasowa zbudowana jest z dwóch regionów o wysokiej homologii międzygatunkowej – regionu bogatego w aminokwasy zasadowe oraz regionu hydrofobowego, zawierającego również niewielką ilość aminokwasów zasadowych. Stwierdzono, że sekwencja wiążąca reszty ADP-rybozylowe nakłada się z ważnymi domenami odpowiadającymi za interakcje: białko-białko, wiązanie DNA, kierowanie białek oraz ich degradację [34].

Białka PARP wiążą DNA, ochraniają wolne końce DNA, modyfikują chromatynę przez ADP-rybozylację białek nukleosomów (przede wszystkim histonu H₁). Substraty PARP obejmują m. in. polimerazy DNA, topoizomery, ligazy, czynniki transkrypcyjne (np. FOS), białko p53, XRCC₁, antygeny jądrowe komórek proliferujących oraz katalityczną podjednostkę zależnej od DNA kinazy białkowej (por. wyżej) [23]. Białka PARP grają ważną rolę w supresji rekombinacji na końcach DNA oraz biorą udział w kotwiczeniu chromatyny w macierzy jądrowej.

Białka te mają również znaczenie dla podtrzymywania długości telomerów i (lub) przekazywania sygnałów wysyłanych przez uszkodzone telomery. Wykazano, że myszy, pozbawione PARP (kodowanego przez gen ADPRT1 [45]), miały o około 30% krótsze telomery niż telomery prawidłowych osobników. Zainteresowanie budziło jednak spostrzeżenie, że lizaty komórkowe myszy pozbawionych PARP wykazywały szczątkową aktywność PARP, którą przypisano tankyrazie – należącej do tzw. nieklasycznych PARP [23].

W badaniach Samper i wsp. u myszy niewykazujących aktywności PARP nie stwierdzono znaczących różnic w długości telomerów. Myszy te jednak były nadwrażliwe na czynniki uszkadzające DNA (stwierdzono brak aktywności DNaz) [37].

Embrionalne fibroblasty myszy pozbawione PARP wykazywały poważną niestabilność genomu przejawiającą się w postaci wzrastającej częstości fuzji chromosomów oraz aneuploidii. Brak PARP nie wpływał jednak na długość jednołańcuchowej protruzji końca DNA (*G overhang*) [1].

Klasycznymi polimerazami poli-ADP-rybozylowymi są białka PARP1, PARP2 i PARP3, z których najlepiej poznanym jest PARP1. Jest to białko o masie 113 tysięcy daltonów, o wysokiej homologii międzygatunkowej, silnie aktywowane przez DNA wykazujący uszkodzenia jednej nici. Podobnie jak białko p53 lub DNA-PK, białko PARP1 ma zdolność wiązania się z DNA i oddziaływania z innymi białkami kontrolującymi integralność genomu (zwłaszcza z białkami uczestniczącymi w reperacji jednołańcuchowych uszkodzeń DNA przez wycinanie). Dodatkowo białko PARP1 ma zdolność automodyfikacji przez ADP-rybozylację, co wpływa m.in. na interakcję z DNA. Drugim produktem genu PARP1 jest białko sPARP1, domena katalityczna o masie 55,3 tysięcy daltonów, które nie jest aktywowane przez uszkodzony DNA. Inne białka z rodziny PARP nie zostały jeszcze opisane [34].

Klasyczne białka PARP są aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenia pojedynczego lub podwójnego łańcucha DNA i ADP-rybozylują liczne białka (m.in. kluczowe regulatory transkrypcji, cyklu komórkowego i naprawy DNA). Aktywacja PARP wyzwala szybki sygnał potranslacyjny, który jest w stanie zatrzymać mechanizmy transkrypcji i (lub) replikacji i uaktywnić mechanizmy naprawcze. Prawdopodobnie PARP działa jako „przełącznik” między procesami transkrypcji i naprawy DNA – poli-ADP-rybozylacja stymuluje procesy naprawy DNA wyciszając jednocześnie transkrypcję [53]. ADP-rybozylacja nie jest trwała, a efektem reakcji może być zarówno aktywacja, jak i hamowanie białek.

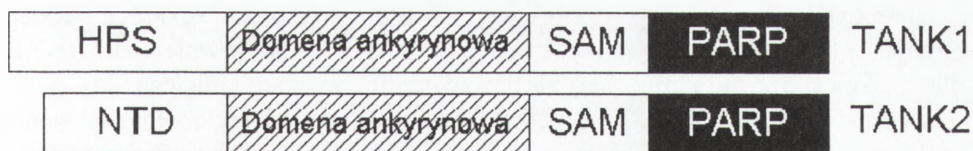
Aktywność PARP prowadzi do znacznego obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia NAD^+ , a w rezultacie ATP, co jest przyczyną śmierci komórki w drodze martwicy. Co więcej, wysoka aktywność PARP może spowodować, że komórka, która wchodzi w apoptozę, jest zmuszona do „przełączenia się” na drogę martwicy. Inhibitory PARP wykazują działanie odwrotne – komórka „przełącza się” pod ich wpływem z martwicy na apoptozę [47]. Obok PARP1 stosunkowo dobrze poznane są tankyrazy – TANK1 i TANK2, należące do tzw. nieklasycznych białek PARP.

Białko TANK1 kodowane przez gen *TNKS*, mający *locus* w chromosomie 8 [23], zostało zidentyfikowane w 1998 roku i zlokalizowane na telomerach chromosomów metafazowych, gdzie oddziałuje z TRF1 – negatywnym regulatorem długości telomerów i prawdopodobnie wchodzi w skład kompleksu białkowego telomerów [39].

TANK1 wykazuje dużą homologię do ankyryn (białek strukturalnych, które wiążą integralne białka błonowe z leżącym pod nimi cytoszkieletem) oraz domeny katalitycznej PARP. Podobnie jak ankyryny ma 24 powtórzenia ankyrynowe – sekwencje zbudowane z 33 aminokwasów. Sekwencja ta odpowiada za oddziaływanie z domeną kwasową TRF1 (68 aminokwasów N-końca) [39].

Region C-końcowy wykazuje aktywność PARP, katalizując tworzenie łańcuchów poli-ADP-rybozylowych na specyficznych białkach. Katalityczna domena PARP wykazuje charakterystyczną strukturę II-rzędową (liczne łańcuchy β i jedna α -helisa), formując rowek znany jako fałd wiążący NAD [39].

Pomiędzy domeną PARP a powtórzeniami ankyrynowymi znajduje się motyw SAM (ang. *sterile alpha module*), który prawdopodobnie bierze udział w oddziaływaniu z



RYCINA 3. Budowa białek TANK1/TANK2: PARP – katalityczna domena PARP, SAM – domena homologiczna z motywem alfa, HPS – domena zawierająca homopolimeryczne powtórzenia histydyna-prolina-seryna w N-końcu, NTD – domena N-końcowa

białkami (TRF1). Region NH₂ końcowy TANK1 zawiera ciągi homopolimeryczne histydyny, seryny i proliny (ryc. 3).

Stwierdzono powszechne występowanie mRNA tankyrazy w ludzkich tkankach, ze szczególnie wysokimi wartościami wykrywanymi w jądrach. Wyniki analizy białka TANK1 (o masie 142 tysięcy daltonów) pokrywały się z wynikiem badania mRNA [39].

Proces ADP-rybozylacji TRF1 *in vitro* przez TANK1 powoduje odłączenie TRF1 od telomerowego DNA. Sugeruje się, że ADP-rybozylacja białka TRF1 umożliwia „otwarcie” kompleksu telomerowego, umożliwiając dostęp telomerazie [41]. Gdy TRF1 ulega nadmiernej ekspresji, znacznie wzrastają wartości wykrywanej tankyrazy [29]. *In vitro* wykazano, że nawet przy dużych stężeniach tankyrazy jedynie mała frakcja TRF1 jest modyfikowana [39]. Gdy TANK1 ulega nadmiernej ekspresji, wzrasta długość telomerów [23, 41]. Ponieważ ADP-rybozylacja obniża zdolność TRF1 do wiązania telomerowego DNA, prawdopodobne jest, że funkcja telomerów w ludzkich komórkach jest regulowana przez ADP-rybozylację. Białko TANK1 może również przyczyniać się do chronienia telomerów przed niewłaściwymi procesami naprawczymi. Białko TRF2 nie jest substratem dla TANK1 z powodu innej budowy końca NH₂ (bogatego w aminokwasy zasadowe), co uniemożliwia interakcję TRF2 - TANK1 [23]. TANK1 wykazuje również zdolność do autoregulacji przez własną ADP-rybozylację. Tworzenie ADP-rybozylowanej tankyrazy zależy proporcjonalnie od stężenia tankyrazy [39].

Prawdopodobnie substratami dla TANK1 są również inne czynniki związane z telomerami, włączając telomerazę. Problem zwiększania lub hamowania aktywności białek kompleksu telomerowego przez działanie TANK1 wymaga rozstrzygnięcia.

Innym zagadnieniem wymagającym wyjaśnienia jest fakt, że TANK1 znajduje się na końcach telomerów tylko w komórkach, które wykazują nadmierną ekspresję TRF1, natomiast w przeważającej większości TANK1 zlokalizowany jest w porach błony jądrowej, w cytoplazmie wokół jądra komórkowego oraz w pęcherzykach Golgiego [23]. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja TANK1 zależy od fazy cyklu komórkowego. Tankyraza w czasie interfazy jest zlokalizowana razem z TRF1 na telomerach oraz wchodzi w skład kompleksów białkowych porów błony jądrowej, natomiast podczas mitozy, gdy dochodzi do zaniku otoczki jądrowej, stwierdzano obecność tankyrazy w macierzy okołocentriolowej centrosomów. Sugeruje się, że lokalizacja tankyrazy na telomerach może być regulowana przez TRF1 lub cykl komórkowy [40].

Białko TANK2 jest kodowane przez gen *TNKS2* o długości 66 kpz, mający *locus* w chromosomie 10. Gen złożony jest z 28 eksonów. Transkrypt ma długość 6,7 kpz. Produktem genu jest 1166-aminokwasowe białko. Białko TANK2 (znane również jako TNKL) zidentyfikowano po raz pierwszy jako białko związane z aparatem Golgiego [24].

Białko TANK2 wykazuje 85% identycznych aminokwasów w obrębie sekwencji PARP, SAM i powtórzeń ankyrynowych oraz podobny wzór dystrybucji wewnątrzkomórkowej jak białko TANK1, ale zawiera unikalną sekwencję NH₂-końcową o wysokiej homologii międzygatunkowej. Podobnie jak białko TANK1 ulega powszechnej ekspresji w ludzkich tkankach. Białko TANK2 oddziałuje z 52-aminokwasową, NH₂-końcową sekwencją TRF1. Jest to również miejsce interakcji białek TANK1-TRF1, dlatego też obie tankyrazy prawdopodobnie współzawodniczą o substrat.

Podobnie jak klasyczne białka PARP, nieklasyczne PARP (tankyrazy) mogą przekazywać sygnały z uszkodzonych telomerów i przez to odgrywać rolę w kontroli stabilności genomu i regulacji senescencji komórki.

Nadmierna ekspresja białka TANK2 indukuje gwałtowną śmierć komórki w wyniku martwicy wskutek nagłej utraty potencjału błonowego mitochondriów. Inhibitor PARP, 3-aminobenzamid, miał zapobiegać śmierci komórki. Okazało się jednak, że jego zdolność do ochrony komórki nie jest wystarczająca i trwała. Komórki wykazujące nadmierną ekspresję białka TANK2 w obecności 3-aminobenzamidu także umierały, jakkolwiek śmierć była opóźniona o kilka dni [23].

Skutek nadmiernej ekspresji obu tankyraz jest zasadniczo odmienny. Fakt ten tłumaczony jest różną wewnętrzną aktywnością PARP, jej regulacją lub istnieniem specyficznych, różnych substratów. Wymaga to jednak dalszych badań.

Białko TANK2 w prawidłowych komórkach wykazuje lokalizację rozproszoną wokół jądra, natomiast w komórkach włókniamięsa – bardziej zintegrowaną [23]. Główna lokalizacja białka TANK2 to cytoplazma. Lyons i wsp. wykazali, że TANK2 oddziałuje z białkiem Grb14, które znajduje się w pęcherzykach Golgiego, regulując jego funkcję [27]. Nai-Wen Chi i Lodish stwierdzili, że TANK2 ma zdolność oddziaływania z IRAP (aminopeptydazą insulinozależną), znajdującą się w pęcherzykach GLUT4, co ma prawdopodobnie znaczenie w regulacji ich metabolizmu [2].

PODSUMOWANIE

Mnogość doniesień naukowych na temat telomerów i telomerazy pojawiających się w ostatnich latach na całym świecie świadczy nie tylko o niezwyklej złożoności mechanizmów regulacji długości telomerów, ale także o dużej roli, jaką zrozumienie tych procesów może odegrać zarówno w diagnostyce i leczeniu nowotworów, jak i w opanowaniu procesów starzenia. Mimo postępu wiedzy na temat struktury telomerazy oraz opracowania metod oceny jej aktywności enzymatycznej wiele zagadnień pozostaje niewyjaśnionych. Identyfikacja białek związanych z telomerazą (TRF1 i TRF2) oraz częściowe poznanie ich funkcji otwiera możliwości odkrycia kolejnych czynników

wpływających na regulację długości telomerów i utrzymanie ich integralności. Coraz dokładniej badany jest wpływ poli-ADP-rybozylacji (TANK1 i TANK2) na telomerazę i białek z nią związanych. Szczegółowe poznanie tych procesów umożliwi zrozumienie zależności między mechanizmami syntezy i naprawy DNA a strukturą i regulacją długości telomerów. Prawdopodobnie ułatwi to w przyszłości skuteczną kontrolę nad procesami nowotworzenia, unieśmiertelniania i starzenia się komórek.

BIBLIOGRAFIA

- [1] d'ADDA-di-FAGAGNA F, HANDE MP, TONG WM, LANSDORP PM, WANG ZQ, JACKSON SP. Functions of poly-(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet* 1999; **23**: 76–80.
- [2] AI-WEN CHI, LODISH HF. Tankyrase is a Golgi-associated mitogen-activated protein-kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem* 2000; **49**: 38437–38444.
- [3] BAILEY SM, CORNFORTH MN, KURIMOSA A, CHEN DJ, GOODWIN EH. Strand Specific Postreplicative Processing of Mammalian Telomeres. *Science* 2001; **293**: 2462–2465.
- [4] BIESSMANN H, MASON JM. Telomeric repeat sequences. *Chromosoma* 1994; **103**: 154–161.
- [5] BILAUD T, BRUN C, ANCELIN K, KOERING CE, GILSON E. Telomeric localization of TRF2 a novel human telobox protein. *Nat Genet* 1997; **17**: 236–239.
- [6] BŁASIAK J. Telomeraza i rak. *Post Biochem* 1999; **45**: 228–238.
- [7] BROCCOLI D, SMOGORZEWSKA A, CHONG L, de LANGE T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins TRF1 and TRF2. *Nat Genet* 1997; **17**: 231–235.
- [8] BROCCOLI D, YOUNG JW, de LANGE T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9082–9086.
- [9] CHAMANKHAH M, XIAO W. Formation of the yeast Mre11-Rad50-Xrs2 complex is correlated with DNA repair and telomere maintenance. *Nucl Acids Res* 1999; **27**: 2072–2079.
- [10] CHONG L, van STEENSEL B, BROCCOLI D, ERDJUMENT-BROMAGE H, HANISH J, TEMPST P, de LANGE T. A human telomeric protein. *Science* 1995; **270**: 1663–1667.
- [11] COUNTER CM, AVILION AA, LeFEUVRE CE, STEWARD NG, GREIDER CW, HARLEY CB, BACCHETTI S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells with express telomerase activity. *EMBO J* 1992; **11**: 1921–1929.
- [12] ENGELHARDT M, KUMAR R, ALBANELL J, PETTENGELL R, HAN W, MOORE MAS. Telomerase regulation, cell cycle and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997; **90**: 182–193.
- [13] FAIRALL L, CHAPMAN L, MOSS H, de LANGE T, RHODES D. Structure of the TRFH Dimerization Domain of the Human Telomeric Proteins TRF1, TRF2. *Cell* 2001; **2**: 351–361.
- [14] FARR C, FANTES J, GOODFELLOW P, COOKE H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7006–7010.
- [15] GOTTSCHLING DE, APARACIO OM, BILLINGTON BL, ZAKIAN VA. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 1990; **63**: 751–762.
- [16] GRIFFITH JD, COMEAU L, ROSENFELD S, STANSEL RM, BIANCHI A, MOSS H, de LANGE T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; **97**: 503–514.
- [17] HANAOKA S, NAGADOI A, YOSHIMURA S, AIMOTO S, LI B, de LANGE T, NISHIMURA Y. NMR Structure of the hRap Myb Motif Reveals a Canonical Three-Helix Bundle Lacking the Positive Surface Charge Typical of Myb DNA Binding Domains. *J Mol Biol* 2001; **312**: 167–175.
- [18] HANISH JP, YANOWITZ J, de LANGE T. Stringent sequence requirements for telomere formation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 8861–8865.
- [19] HAWLEY RS. Sticky endings: separating telomeres. *Science* 1997; **276**: 1215.

- [20] HODES RJ. Telomere length, aging and somatic cell turnover. *J Exp Med* 1999; **190**: 153–156.
- [21] HOLT SE, WRIGHT WE, SHAY JW. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol* 1996; **37**: 2932–2939.
- [22] HORVATH MP, SCHWEIKER VL, BEVILACQA JM, RUGGLES JA, SCHULTZ SC. Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* 1998; **95** : 963–974.
- [23] KAMINKER PG, SAHN-HO KIM, TAYLOR RD, ZEBARJADIAN Y, FUNK WD, MORIN GB, YASWEN P, CAMPISI J. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 2001, **38**: 35891–35899.
- [24] KUIMOV AN, KUPRASH DV, PETROV VN, VDOVICHENKO KK, SCANLAN MJ, JONGENEEL CV, LAGARKOVA MA, NEDOSPASOV SA. Cloning and characterization of TNKL, a member of tankyrase gene family. *Genes Immunol* 2001; **2**: 52–55.
- [25] KIM SH, KAMINKER P, CAMPISI J. TIN 2 a New Regulator of Telomere Length in Human Cells. *Nat Genet* 1999; **23**: 405–412.
- [26] de LANGE T. Telomere dynamics and genome stability in human cancer. *Cold Spring Harbour Press* 1995; 285–295.
- [27] LYONS RJ, DEANE R, LYNCH DK, ZHENG-SHENG J YE, SANDERSON GM, EYRE HJ, SUTHERLAND GR, DALY RJ. Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J Biol Chem* 2001, **20**: 17172–17180.
- [28] MAKAROV VL, HIROSE Y, LANGMORE JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997; **88**: 647–666.
- [29] MATSUTANI N, YOKOZAKI H, TAHARA E, TAHARA H, KUNIASU H, HARUMA K, CHAYAMA K, YASUI W, TAHARA E. Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2001; **19**: 507–512.
- [30] McELLIGOTT R, WELLINGER RJ. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 1997; **16**: 3705–3714.
- [31] NORRBACK K-F, DAHLENBORG K, CARLSSON R, ROOS G. Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1996; **88**: 222–229.
- [32] NOWAK J, LEWANDOWSKI K, JANUSZKIEWICZ D. Rola telomerazy w rozwoju procesu nowotworowego. *Post Biol Kom* 2000; **14**: 143–150.
- [33] NOWIS D, GOŁĄB J. Rola telomerów i telomerazy w progresji nowotworów. Perspektywy diagnostyczne i terapeutyczne. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 243–261.
- [34] PLESCHKE JM, KLECZKOWSKA HE, STROHM M, ALTHAUS FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoints proteins. *J Biol Chem* 2000; **52**: 40974–40980.
- [35] ROCKMILL B, ROEDER GS. Telomere-mediated chromosome pairing during meiosis in budding yeast. *Genes Dev* 1998; **12**: 2574–2586.
- [36] RUFER N, BRUMMENDORF TH, KOLVRAA S, BISCHOFF C, CHRISTENSEN K, WADSWORTH L, SCHULZER M, LANSDORP PM. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocytes subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 1999; **190**: 157–167.
- [37] SAMPER E, GOYTISOLO FA, MENISSIER-de-MURCIA J, GONZALEZ-SUAREZ E, CIGUDOSA JC, de MURCIA G, BLASCO MA. Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability. *J Cell Biol* 2001; **154**: 49–60.
- [38] SHAY JW, WERBIN H, WRIGHT WE. Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia* 1996; **10**: 1255–1261.
- [39] SMITH S, GIRIAT I, SCHMITT A, de LANGE T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998; **282**: 1484–1487.

- [40] SMITH S, de LANGE T. Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J Cell Science* 1999; **112**: 3649–3656.
- [41] SMITH S, de LANGE T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 2000; **10**: 1299–1302.
- [42] SMITH S, de LANGE T. TRF1 a mammalian telomeric protein. *Trends Genet* 1997; **13**: 21–26.
- [43] SMOGORZEWSKA A, van STEENSEL B, BIANCHI A, OELMANN S, SCHAEFER MR, SCHNAPP G, de LANGE T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1659–1668.
- [44] van STEENSEL B, SMOGORZEWSKA A, de LANGE T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; **92**: 401–413.
- [45] STILL IH, VINCE P, COWELL JK. Identification of a novel gene (ADPRT1) encoding a potential Poly(ADP-ribose)transferase protein. *Genomics* 1999; **62**: 533–536.
- [46] SZALATA M, SŁOMSKI R. Zakończenia chromosomów: telomery, telomeraza i białka współdziałające. *Post Biol Kom* 2000; **14**: 95–117.
- [47] TENTORI L, BALDUZZI A, PORTARENA I, LEVATI L, VERNOLE P, GOLD B, BONMASSAR E, GRAZIANI G. Poly ADP-ribose polymerase inhibitor increases apoptosis induced by a DNA minor groove binding methyl sulfonate ester. *Cell Death Different* 2001; **8**: 817–828.
- [48] WELLINGER RJ, SEN D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 135–749.
- [49] WERDA L, SKOTNICKI AB. Telomeazy i telomeraza w białaczkach. *Przegl Lek* 1999; **56**: 668–670.
- [50] WILLIAMSON JR, RAGHURAMAN MK, CECH TR : Monovalent cation- induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* 1989; **59** : 871–880.
- [51] WOJCIEROWSKI J. Geny i Genomy. *Wyd. Scientific Press & Information*, Lublin, 1999.
- [52] WRIGHT WE, TESMER VM, HUFFMAN KE, LEVENE SD, SHAY JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 1997; **11**: 2801.
- [53] ZIEGLER M, OEI SL. A cellular survival switch: poly ADP-ribosylation stimulates DNA repair and silences transcription. *BioAssays* 2001; **23**: 543–548.
- [54] ŻARKO-PODSTAWKA M, ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA J. Liniowy chromosom prokariotyczny; struktura i synteza telomerów. *Post Bioch* 1997; **43**:12–17.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.09. 2002 r.

Przyjęto: 12.10. 2002 r.

ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin

e-mail: kocki@hipokrates.am.lublin.pl

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. 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 2003 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

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 40 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:

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 25 dollars USA

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

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

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 215) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejny tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Expil 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 zapożyczane z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł** nie przekraczający 15 str. druku.

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin

Treść pracy nie była uprzednio publikowana,

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę

nie została wysłana do innej redakcji

tak nie

Jest zgoda osób, których informacje nie-

Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z

publikowane są zamieszczone w tekście

podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego

z komputera IBM

tak nie

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

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

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym zeszyście PBK	1
ALBRECHT J.: Profesor Mirosław Mossakowski: Neurobiolog – intuicjonista i wizjoner – Wspomnienie In memoriam: Professor Mirosław Mossakowski – A neurobiologist with intuition and vision	3
BAŚKIEWICZ-MASIUK M., MACHALIŃSKI B.: Rola białek STAT5 w schorzeniach układu krwiotwórczego The role of STAT5 proteins in hematologic diseases	9
SZALATY M.: Udział cGMP w szlakach transdukcji sygnałów w komórkach roślinnych The role of cGMP in signal transduction pathways in plant cells	31
KMIEĆ Z.: Rola komórek gwiaździstych w regulacji funkcji wątroby. I. Morfologia i właściwości komórek gwiaździstych <i>in situ</i> oraz w hodowli komórkowej The role of hepatic stellate cells in the regulation of liver functions. I. Morphology and characteristics of intact and cultured cells	47
KMIEĆ Z.: Rola komórek gwiaździstych w regulacji funkcji wątroby. II. Współdziałanie z innymi komórkami w rozwoju włóknienia wątroby The role of hepatic stellate cells in the regulation of liver functions. II. Cooperation with other cell types in the development of liver fibrosis	61
LEHMANN P.: Wyciszenie RNA; naturalny system obronny roślin przeciw infekcji wirusowej RNA silencing as a plant innate system against viral infection	75
HETMANN A., KOWALCZYK S.: Mono- i disacharydy – drożdżowymi, roślinnymi i zwierzęcymi cząsteczkami sygnałowymi regulującymi ekspresję genów Mono- i disaccharides – signaling molecules regulating genes expression in yeasts, plant and animal cells	87
MRÓZ P., MŁYNARCZUK I.: Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów TRAIL – Apoptosis induction mechanisms and its employment in cancer therapy.	113
KILIAŃSKA Z. M., MIŚKIEWICZ A.: Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy Caspases of the vertebrates — Their role in apoptosis	129
SKIBSKA B., OKRÓJ W., WALKOWIAK B.: Charakterystyka płytkowych receptorów dla ADP – Characterisation of platelets ADP receptors	153
OLSZEWSKA M. J.: DNA i białka centromerowe – Centromeric DNA and proteins	167
DADAN J., ZBUCKI R.: Komórki C tarczycy i ich rola – C cells of the thyroid gland and their function.	187
SKÓRZYŃSKA K., KOLANO J., KOCKI J., WOJCIEROWSKI J.: Białka TRF1/TRF2 oraz TANK1/TANK2 i ich udział w regulacji długości telomerów – The TRF1/TRF2 and the TANK1/TANK2 proteins and their role in the telomeres length regulation	201
Komunikaty	215