PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

Advances in Cell Biology

VOL. 30, ISSUE 2/2003
(217–402)

www.pbkom.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30, 2003 NR 2 (217-402)
ADVANCES IN CELL BIOLOGY VOL. 30, 2003 NR 2 (217-402)

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, partialy 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 conctraction, 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.Ingardena6*
Maciej ZABEL–histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek– histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybrydocytochemistry), cell ultrastructure–*Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul.Chałubińskiego 6a*
Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*
Rada Redakcyjna – Advisory Board:
Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORĄŻY, 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

Indexed in: National Library of Medicine, Bathesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich`s International Periodicals Directory, New Jersey

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be adressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd.15,5. Ark. druk.11,75. Podpisano do druku w lutym 2003 r. Druk ukończono w kwietniu 2003 r.

http://rcin.org.pl

Instytut Biologii Doświadczalnej
Biblioteka
P.A.N.

W TYM ZESZYCIE PBK

Zegar biologiczny u ssaków jest umieszczony w jądrach nadskrzyżowaniowych (SCN) podwzgórza. Serotonina i jej agoniści mają zdolność przesuwania fazy rytmu aktywności neuronalnej SCN. Bierze ona także udział w oddziaływaniu czynnikow nieświetlnych na funkcjonowanie zegara okołodobowego. Problem ten jest omawiany w artykule na stronie 219.

Transkrypty genów mitochondrialnych, zanim w pełni przekształcą się w dojrzały mRNA, podlegają modyfikacjom potranslacyjnym. W artykule na stronie 243 omawiany jest wpływ dojrzewania 3' końca RNA na stabilność i degradacje transkryptów mRNA w mitochondriach roślin.

Niestabilność genetyczna, chromosomowa lub mikrosatelitarna jest jedną z cech komórek nowotworowych. W komórkach nowotworowych zarówno guzów litych, jak i nowotworów układu krwiotwórczego niestabilność chromosomowa wyraża się nagromadzeniem aberracji strukturalnych i liczbowych chromosomów. W artykule na stronie 259 przedstawiono poglądy opisujące mechanizmy powstawania aberracji, jak i metody ich diagnozowania.

DNA komórkowy podlega nieustannym uszkodzeniom; działanie punktów kontrolnych cyklu komórkowego jest częścią odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie DNA. Sygnalizacja potrzebna do zatrzymania komórek w fazach G1, S lub G2 wychodzi od kinazy Atm, której najważniejszymi substratami są kinazy efektorowe we wszystkich trzech punktach kontrolnych, białko Tp53 blokujące przejście przez granicę faz G1/S, nibryna na przejściu punktu kontrolnego S oraz Brca 1 w punktach kontrolnych S i G2. Więcej informacji na te tematy można znaleźć na stronie 359.

Znaczenie infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) wiąże się głównie z ułatwianiem procesów przeżycia komórek oraz oddziaływania onkoprotein wirusowych z cyklinami cyklu komórkowego. Zakażenie HPV może prowadzić do niekontrolowanej proliferacji komórek i w końcu do zmian nowotworowych. Więcej na ten temat Czytelnik znajdzie na stronie 311.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (219–227)

UDZIAŁ UKŁADU SEROTONINOWEGO W FUNKCJONOWANIU ZEGARA BIOLOGICZNEGO SSAKÓW

PARTICIPATION OF SEROTONERGIC SYSTEM IN FUNCTION OF MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCK

Magdalena ONISZK, Grażyna BARBACKA-SUROWIAK

Pracownia Neurofizjologii i Chronobiologii, Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Serotonina jest ważnym neuroprzekaźnikiem odgrywającym rolę w funkcjonowaniu organizmu przez regulację procesów fizjologicznych i behawioralnych. Ma także udział w kontrolowaniu działania zegara biologicznego, umieszczonego w jądrach nadskrzyżowaniowych (SCN) podwzgórza. Unerwienie serotoninergiczne pochodzi ze środkowego jądra szwu śródmózgowia i wchodzi w interakcje z pozostałymi dwoma głównymi projekcjami dochodzącymi do SCN. Podstawowa rola serotoniny polega na modulowaniu pracy zegara biologicznego przez osłabienie przenoszenia informacji świetlnej docierającej do SCN. Zachodzi to w wyniku aktywacji receptorów 5HT1A, 5HT1B oraz 5HT7 i ma znaczenie w dostosowaniu zegara do oświetlenia środowiskowego. Serotonina i jej agoniści mają zdolność przesuwania fazy rytmu aktywności neuronalnej SCN. Bierze także udział w oddziaływaniu czynników nieświetlnych na funkcjonowanie zegara okołodobowego.

Słowa kluczowe: serotonina, rytmy okołodobowe, SCN, czynniki świetlne, czynniki nieświetlne.

Summary: Serotonin plays an important role in function of the organism as a regulator of physiological and behavioral processes. Serotonin participates in the control of the biological clock located in suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus. Serotonergic innervation arises from the midbrain median raphe nuclei and interacts with other two main projections to the SCN. The basic role of serotonin is to modulate function of the biological clock by attenuation of the photic information transmitted to the SCN. This modulation through the activation of 5HT1A, 5HT1B and 5HT7 receptors is important for the entrainment of the clock to the environmental illumination. Serotonin and 5HT agonists are capable to phase-shift the SCN neuronal activity rhythm. Serotonin is also implicated in altering the function of the clock by non-photic stimuli.

Key words: serotonin, circadian rhythms, SCN, photic stimuli, non-photic stimuli.

http://rcin.org.pl

Serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT) to substancja z rodziny indolamin, pochodna tryptofanu, zidentyfikowana jako przekaźnik neurochemiczny. Odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu nie tylko mózgu, ale i całego organizmu. Bierze udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych i behawioralnych [16]. Znana jest ze zdolności do modulowania różnych stanów fizjologicznych: temperatury ciała, ciśnienia krwi, aktywności endokrynnej, apetytu, zachowania seksualnego (głównie samic – [25]), ruchu i odczuwania bólu [21]. Uczestniczy także w bilansie płynu pozakomórkowego [51] i aktywności oddechowej [19]. Działa jako inhibitor (czynnik hamujący) kontroli poboru paszy [10]. Jest szeroko rozpowszechniona w Ośrodkowym Układzie Nerwowym (OUN), gdzie uczestniczy w regulacji licznych procesów, m.in. cyklu snu i czuwania, aktywności motorycznej czy termoregulacji [23]. Nie można pominąć roli serotoniny w modulacji funkcjonowania czuciowego (sensorycznego) i procesów poznawczych oraz uczenia [12], a także w zachowaniu równowagi psychicznej. W licznych badaniach bierze się pod uwagę przypuszczalny związek serotoniny ze stanami emocjonalnymi i nastrojem, zachowaniem samobójczym czy chorobami psychicznymi, np. depresją [53], niepokojem, pobudzeniem lub agresją [9]. Zaburzenia w przekaźnictwie nerwowym układu serotoninergicznego mają odzwierciedlenie w nieprawidłowościach funkcjonowania emocjonalnego. Leczenie różnych chorób i zaburzeń odbywa się m.in. przez stosowanie czynników regulujących poziom serotoniny. Serotonina wpływa także na działanie innych hormonów i układów neuroprzekaźników, m.in. na dopaminę [27] czy układ cholinergiczny [15]. Również zachowanie (behawior) zwierząt podlega wpływom tego ważnego mózgowego przekaźnika, regulującego zachowania związane z unikaniem, ucieczką, odkrywaniem czy warunkowaniem kontekstowym [2]. Serotonina wywiera wpływ na różnorodne funkcje organizmu dzięki obecności dużej liczby typów i podtypów receptorów [4].

Serotonina wywiera także wpływ na pracę zegara biologicznego. Centralny regulator rytmu zlokalizowany jest w jądrach nadskrzyżowaniowych (SCN – *suprachiasmatic nuclei*), parzystych strukturach leżących nad skrzyżowaniem wzrokowym, w przedniej części podwzgórza, po obu stronach komory III mózgu. SCN stanowi oscylator okołodobowy, synchronizowany przez światło, kluczowy dla ekspresji fizjologicznych i behawioralnych rytmów okołodobowych [5].

Zegar biologiczny otrzymuje informacje świetlne (fotyczne) dochodzące z siatkówki oka drogą siatkówkowo-podwzgórzową (RHT – *retino-hypothalamic tract*), a także informacje świetlne i nieświetlne (niefotyczne) z listka ciał kolankowatych bocznych (IGL – *intergeniculate leaflet*) drogą kolankowato-podwzgórzową (GHT – *geniculo-hypothalamic tract*).

Trzecią ważną drogą jest droga serotoninergiczna [28,37]. Projekcja ta należy do najgęstszych w mózgu [3, 44]. Pochodzi z kompleksu jąder szwu śródmózgowia, konkretnie z jądra środkowego – MRN (*median raphe nucleus*) [3, 28]. Początkowo sądzono, że projekcja ta ma źródło w jądrze grzbietowym szwu (DRN – *dorsal raphe nucleus*), jednak liczne badania z użyciem znaczników [22,28,32] wykazały, że włókna serotoninowe w SCN różnych gatunków gryzoni biorą swój początek w MRN. DRN odpowiada natomiast za unerwienie serotoninergiczne IGL [29,34] i – przez te struktury

http://rcin.org.pl

– pośrednio SCN. Aferentne włókna serotoninowe w SCN (ściślej w części brzusznej jąder) zachodzą na zakończenia siatkówkowe i GHT [33,38] sugerując przypuszczalne interakcje między tymi systemami przekaźnictwa w jądrach. U szczura zakończenia serotoninowe są rozprzestrzenione przednio-tylnie w części brzuszno-bocznej SCN, blisko zakończeń RHT [54], tworząc kontakty akso-dendrytyczne i akso-somatyczne z neuronami SCN zawierającymi m.in. VIP (wazoaktywny peptyd jelitowy) [7]. W przypadku chomika są skupione w rejonie brzusznym i brzuszno-przyśrodkowym jąder [38,52]. U myszy zlokalizowano je w środkowej i środkowo-brzusznej części rdzennej, w przednich i tylnich partiach SCN [1].

Wejście serotoninergiczne nie jest niezbędne do synchronizacji ze środowiskiem zewnętrznym [35], konieczny i wystarczający do pełnienia tej roli jest szlak RHT. Projekcja ta odgrywa jednak ważną rolę modulującą działanie zegara okołodobowego i mechanizm synchronizujący rytmikę okołodobową [42]. Wyniki badań z zastosowaniem neurotoksyny niszczącej unerwienie serotoninergiczne (5,7-DHT – 5,7-dihydroksytryptamina) wskazują na zmiany w aktywności lokomotorycznej zwierząt: przyspieszenie fazy aktywnej (α), wcześniejsze jej rozpoczęcie, późniejsze zakończenie, dłuższe trwanie tej fazy, ale niezwiązane ze wzrostem całkowitej aktywności. Jest to szczególnie widoczne w warunkach stałego oświetlenia [28,35], kiedy to dodatkowo pojawia się tzw. rozszczepienie rytmu (*splitting*) na dwie składowe oraz zakłócenia rytmiczności. Takie efekty pojawiają się również u „normalnych" (bez zniszczenia jąder szwu) zwierząt, głównie chomików, jednak w przypadku osobników ze zniszczeniem (lezją) neuronów serotoninergicznych MRN zjawiska te są dużo częstsze i bardziej nasilone. Prowadzi to do stwierdzenia, że zwierzęta pozbawione unerwienia serotoninowego SCN są wrażliwsze na światło, wykazują silniejszą odpowiedź na działanie czynników fotycznych [34]. Potwierdzeniem może być znacząco większa odpowiedź na światło lub wzbudzana światłem ekspresja białka Fos (produktu genu wczesnej odpowiedzi komórkowej). Dotyczy to komórek SCN myszy ze zniszczonym unerwieniem serotoninergicznym po zastosowaniu 5,7-DHT [8].

Podobny skutek do działania neurotoksyny następuje w przypadku utraty neuronów serotoninergicznych pochodzących z MRN, ale nie DRN [35].

Rola serotoniny w regulacji funkcji zegara okołodobowego nie jest do końca wyjaśniona. Najlepiej poznaną i najważniejszą wydaje się być modulacja przenoszenia informacji fotycznej za pośrednictwem RHT. Oznacza to zmianę odpowiedzi zegara na różną intensywność światła po zastosowaniu agonistów receptora serotoninowego [49]. Poparciem tej hipotezy jest fakt osłabienia odpowiedzi SCN na bodźce przenoszone drogą siatkówkowo-podwzgórzową (RHT), przede wszystkim aktywności neuronalnej pobudzanej przez światło [30] oraz aktywacji genów wczesnej odpowiedzi komórkowej, molekularnej podstawy zegara [44,47]. Regulacja ta obecna jest również w warunkach *in vitro* jako wpływ na ustawienie fazy zegara przez czynniki niefotyczne [43]. Przykładowo agonista receptorów 5HT1A i 5HT7, 8-OH-DPAT (8-hydroksy-dipropylaminotetralina), ma zdolność do osłabiania (w sposób zależny od wielkości podanej dawki) przesunięć fazy rytmu SCN u chomika pod wpływem światła w fazie aktywnej [55]. Serotonina może też działać podobnie jak światło (naśladować je) przy przesuwaniu fazy oscylatora, czego dowodzi działanie agonisty receptora serotoninowego, kwipazyny.

http://rcin.org.pl

Podanie tej substancji szczurom wczesną nocą powoduje opóźnienie fazy, a późną nocą – przyspieszenie [36].

Na typ i siłę działania serotoniny wywierają duży wpływ zarówno różnice gatunkowe, jak i mnogość oraz zróżnicowanie receptorów w tym uczestniczących. W efekt modulujący pracę zegara zaangażowane są głównie podtypy receptorów 5HT1A, 5HT1B oraz 5HT7. Wszystkie one swoiście wpływają na wrażliwość SCN na światło.

Aktywacja receptorów 5HT1B zlokalizowanych presynaptycznie na zakończeniach nerwu wzrokowego [5,6,26,40] powoduje zmianę wejścia siatkówkowego do SCN. Objawia się to hamowaniem przesunięć fazy rytmu okołodobowej aktywności lokomotorycznej i behawioralnej wzbudzonych światłem [40] oraz ekspresji białka c-Fos [13,39] po podaniu systemowym lub bezpośrednio do SCN agonistów 5HT1B u chomika. Ponadto następuje obniżenie indukowanego przez światło zahamowania produkcji melatoniny w szyszynce [45] oraz redukcja amplitudy glutaminianergicznych, pobudzających postsynaptycznych prądów (EPSCs – *excitatory postsynaptic currents*) wywołanych stymulacją nerwu wzrokowego *in vitro* [40]. Modulacja wejścia RHT do SCN przez receptory 5HT1B odbywa się presynaptycznie przez hamowanie uwalniania glutaminianu z zakończeń siatkówkowych, wskutek czego następuje osłabienie efektu działania czynników fotycznych na oscylator SCN [5].

Dowodem na udział receptorów 5HT1B jest fakt, że działanie agonistów 5HT1B na wpływ światła na rytmikę okołodobową jest zredukowane przez wcześniejsze podanie antagonistów tego receptora [45] i zniesione u myszy pozbawionych genetycznie receptora 5HT1B [40,50]. Manrique i wsp. [26] sugerują lokalizację presynaptyczną receptorów 5HT1B w SCN na włóknach aferentnych IGL, co może być źródłem modyfikowania pośredniego wejścia siatkówkowego do SCN przez IGL. Potwierdzeniem obecności podtypu receptora 5HT1B są wyniki badań, w których stosowano wiązanie ligandów, aby zidentyfikować miejsca wiążące 5HT1B w SCN gryzoni [42]. O presynaptycznym działaniu tego receptora świadczy bardzo słaba ekspresja mRNA 5HT1B w SCN. Receptory 5HT1B występują również, choć w dużo mniejszym stopniu, w cytoplazmie komórek nabłonka małych naczyń krwionośnych i kapilar w SCN oraz somatodendrytycznie w tym jądrze [5].

Inne podtypy receptorów serotoninowych również biorą udział w modulacji oddziaływania czynników fotycznych na zegar biologiczny. Stosunkowo niedawno odkryty podtyp receptora 5HT7 jest przypuszczalnie odpowiedzialny za zmiany rytmu okołodobowego aktywności neuronalnej skrawków SCN *in vitro* powodowane działaniem agonistów receptorów serotoninowych [24]. Jego aktywacja powoduje hamowanie prądów wywołanych pobudzeniem receptora $GABA_A$ w neuronach SCN [20]. Przypisuje się mu też pośredniczenie w hamowaniu wejścia fotycznego do zegara [56] oraz – podobnie jak w przypadku receptora 5HT1B – zatrzymanie EPSCs wywołanych stymulacją nerwu wzrokowego w skrawkach SCN [51]. To działanie ma charakter presynaptyczny, czego potwierdzeniem jest obecność średniej do dużej liczby miejsc wiążących receptor 5HT7 [11], niska do średniej ekspresja mRNA tego receptora w SCN gryzoni [14,44] oraz obecność funkcjonalnego receptora 5HT7 w oscylatorze okołodobowym chomika [44]. Dodatkowym dowodem jest obecność

http://rcin.org.pl

somatodendrytycznych receptorów 5HT7 na neuronach GABAergicznych i presynaptycznych receptorów 5HT7 na zakończeniach GABA w SCN [5], odpowiedzialnych za zahamowanie IPSCs (*inhibitory presynaptic currents*) GABAergicznych w neuronach SCN. Odbywa się to poprzez presynaptyczną inhibicję wyrzutu GABA [17]. Działanie postsynaptyczne na receptor 5HT1A lub 5HT7 powoduje blokadę działania glutaminianu (czyli blokadę przesuwania fazy rytmów okołodobowych) [50,55]. Badania z użyciem agonisty receptorów 5HT1A i 5HT7, 8-OH-DPAT, wykazały, że systemowe podanie tego leku znacząco osłabiło wzbudzone światłem przesunięcia fazy rytmu – opóźnienia i przyspieszenia [44] w sposób zależny od dawki. Po podaniu tego agonisty bezpośrednio do SCN przyspieszenie fazy wywołane światłem było takie samo jak przy podaniu systemowym, co wskazywałoby na działanie modulujące przez receptory umieszczone w rejonie SCN [55].

Aktywacja receptorów 5HT1A i 5HT7 odgrywa rolę w modulacji odpowiedzi neuronów SCN na światło dochodzące z siatkówki. Odbywa się to przez zahamowanie wzbudzonej światłem ekspresji białka Fos, zachodzącej w części brzusznej i środkowej zegara, oraz zmniejszenie liczby komórek reagujących na światło w SCN po podaniu agonisty jednocześnie ze światłem [46]. Podobnie jest w przypadku wpływu światła na produkcję melatoniny – efekt stymulacji receptorów 5HT1A i 5HT7 przypomina aktywację receptora 5HT1B. Działanie 8-OH-DPAT wydaje się odbywać przez pośrednictwo postsynaptycznego receptora 5HT7 [20,24]. Efekt ten może być zablokowany wcześniejszym potraktowaniem specyficznymi antagonistami receptora 5HT7, a nie 5HT1A (ritanseryna). Może być również naśladowany przez działanie aktywatorów kaskady przenoszenia sygnału inicjowanej podniesieniem poziomu cAMP, co wskazuje na udział podtypu receptora 5HT7 [44]. Działanie 8-OH-DPAT przypomina działanie czynników niefotycznych – indukuje duże przyspieszenia fazy rytmu aktywności neuronalnej skrawków SCN w subiektywnym dniu i mniejsze opóźnienia w subiektywnej nocy [48]. Oprócz tego hamuje wzbudzaną działaniem światła aktywność neuronów SCN u chomika oraz osłabia stopień wyładowań neuronów, które odpowiadają na pobudzenie fotyczne [56].

Receptory 5HT1B [13], 5HT1A oraz 5HT7 modulują wyrzut glutaminianu bezpośrednio przy braku aktywacji RHT przez informację fotyczną. Dowodem tego jest fakt, że podanie substancji działających w tym przypadku jako agoniści wyżej wymienionych receptorów (kwipazyna, 8-OH-DPAT oraz TFMPP – trifluorometylofenylopiperazyna) do rejonu SCN chomika [47] powoduje redukcję pozakomórkowego stężenia glutaminianu w skrawkach podwzgórza.

Badania *in vitro* [41] dowodzą, że serotonina może przyspieszać zegar przy podaniu w subiektywnym dniu i opóźniać go w subiektywnej nocy. Prosser [41] sugeruje, że przyspieszenia dzienne spowodowane są stymulacją receptora 5HT7, aktywacją cyklazy adenylanowej i kinazy białkowej A oraz otwarciem kanału potasowego. Dla tych przesunięć fazy kluczowa może też być synteza nowych, niezidentyfikowanych jeszcze białek, gdyż czynniki hamujące transkrypcję i translację blokują przyspieszenia dzienne wywołane działaniem serotoniny *in vitro* [18].

http://rcin.org.pl

W opóźnieniu fazy rytmu SCN w odpowiedzi na światło mogą pośredniczyć receptory 5HT1A. Potwierdzają to badania Smart i Biello [49] prowadzone na chomikach – systemowe podanie antagonisty receptora 5HT1A, WAY-100635, znacząco zwiększyło opóźnienie fazy zegara.

Oprócz wpływu na czynniki fotyczne, działające na zegar biologiczny, sugeruje się udział serotoniny w przesunięciach fazy wywołanych czynnikami niefotycznymi, głównie behawioralnymi [31]. Dowodem na to może być fakt, że podczas wzmożonej aktywności czy pozbawienia snu, które to stany działają na SCN jak czynniki niefotyczne, następuje znaczące zwiększenie wyrzutu serotoniny w jądrach nadskrzyżowaniowych.

Ponadto zniszczenie włókien aferentnych serotoninowych do SCN osłabia przesunięcia fazy czy synchronizację wzbudzaną przez aktywność w odpowiedzi na niektóre (ale nie wszystkie) czynniki stymulujące. To działanie serotoniny nie jest dostatecznie wyjaśnione i doniesienia na ten temat są ciągle sprzeczne. Jest to, być może, spowodowane różnicami gatunkowymi (u myszy wpływ serotoniny na ustawianie fazy zegara poprzez pobudzenie behawioralne jest bardziej widoczny niż u chomika). Wpływ może mieć również czas podania czynników farmakologicznych (zależność od fazy), wielkość dawki czy stosowana metoda doświadczalna. Efekt podobny do działania czynników niefotycznych serotonina może wywierać przez ścieżki pośrednie, interakcje z innymi układami przekaźników, głównie neuropeptydem Y (NPY) czy komórkami glejowymi. Być może serotonina działa tu inną drogą (pośrednią przez IGL) i bezpośrednio na komórki oscylatora [31].

Reasumując, można stwierdzić, że serotonina, mimo iż nie jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania zegara biologicznego, wywiera ważny modulujący wpływ na jego pracę. Zachodzi to głównie w drodze zmiany odpowiedzi SCN na światło, w czym biorą udział receptory 5HT1A, 5HT1B oraz 5HT7. W środowisku naturalnym jest to ważne dla minimalizowania czasu potrzebnego do „nastawienia" zegara biologicznego i dostosowania go do warunków świetlnych środowiska [44]. Prawdopodobne jest także pośrednictwo serotoniny w działaniu czynników niefotycznych, choć odbywa się to w odmienny sposób niż w przypadku oddziaływania fotycznego. Zagadnienie to wymaga jednak podjęcia dalszych badań.

LITERATURA

[1] ABRAHAMSON EE, MOORE RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 2001; **916**: 172–191.

[2] AVANZI V, BRANDÃO ML. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual coditioning in rats. *Behav Brain Res* 2001; **126**: 175–184.

[3] AZMITIA EC, SEGAL M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 1978; **179**: 641–667.

[4] BARNES NM, SHARP T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; **38**: 1083–1152.

http://rcin.org.pl

[5] BELENKY MA, PICKARD GE. Subcellular Distribution of 5-HT_{1B} and 5-HT_7 Receptors in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. *J Comp Neurol* 2001; **433**: 371–388.

[6] BOSCHERT U, AMARA DA, SEGU L, HEN R. The mouse 5-hydroxytryptamine$_{1B}$ receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience* 1994; **58**: 167–182.

[7] BOSLER O, BEAUDET A. VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytology* 1985; **14**: 749–763.

[8] BRADBURY MJ, DEMENT WC, EDGAR DM. Serotonin-containing fibers in the suprachiasmatic hypothalamus attenuate light-induced phase delays in mice. *Brain Res* 1997; **768**: 125–134.

[9] CAGAMPANG FRA, YAMAZAKI S, OTORI Y, INOUYE S-IT. Serotonin in the raphe nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. *NeuroReport* 1993; **4**: 49–52.

[10] CURRIE PJ, COSCINA DV. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. *NeuroReport* 1993; **4**: 1105–1107.

[11] DUNCAN MJ, SHORT J, WHEELER DL. Comparison of the effects of aging on 5-HT_7 and 5-HT_{1A} receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain Res* 1999; **869**: 39–45.

[12] FITE KV, JANUŠONIS S, FOOTE W, BENGSTON L. Retinal Afferents to the Dorsal Raphe Nucleus in Rats and Mongolian gerbils. *J Comp Neurology* 1999; **414**: 469–484.

[13] GLASS JD, SELIM M, REA MA. Modulation of light-induced C-Fos expression in the suprachiasmatic nuclei by 5-HT_{1A} receptor agonists. *Brain Res* 1994; **638**: 235–242.

[14] HEIDMANN DEA, SZOT P, KOHEN R, HAMBLIN MW. Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine7 (5-HT7) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* 1998; **37**: 1621–1632.

[15] HELLWEG R, THOMAS H, ARNSWALD A, VON RICHTHOFEN S, KAY S, FINK H, MORGENSTERN R, HÖRTNAGL H. Serotonergic lesion of median raphe nucleus alters nerve growth factor content and vulnerability of cholinergic septohippocampal neurons in rat. *Brain Res* 2001; **907**: 100–108.

[16] JACOBS BL, AZMITIA EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; **72**: 165–229.

[17] JIANG Z-G, TESHIMA K, YANG Y, YOSHIOKA T, ALLEN CN. Pre- and postsynaptic actions of serotonin on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* 2000; **866**: 247–256.

[18] JOVANOVSKA A, PROSSER RA. Translational and Transcriptional Inhibitors Block Serotonergic Phase Advances of the Suprachiasmatic Nucleus Circadian Pacemaker *In Vitro*. *J Biol Rhythms* 2002; **17(2)**: 137–146.

[19] KAEHLER ST, SINGEWALD N, PHILIPPU A. Dependence of serotonin release in the locus coeruleus on dorsal raphe neuronal activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; **359**: 386–393.

[20] KAWAHARA F, SAITO H, KATSUKI H. Inhibition by 5-HT7-receptor stimulation of $GABA_A$ receptor-activated current in cultured rat suprachiasmatic neurons. *J Physiol (London)* 1994; **478**: 67–73.

[21] KUHN DM, ARTHUR RE. L-DOPA-quinone inactivates tryptophan hydroxylase and converts the enzyme to a redox-cycling quinoprotein. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; **73**: 78–84.

[22] LEANDER P, VRANG N, MØLLER M. Neuronal Projections From the Mesencephalic Raphe Nuclear Complex to the Suprachiasmatic Nucleus and the Deep Pineal Gland of the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurology* 1998; **399**: 73–93.

[23] LEGER L, CHARNEY Y, HOF PR, BOURAS C, CESPUGLIO R. Anatomical Distribution of Serotonin-Containing Neurons and Axons in the Central Nervous System of the Cat. *J Comp Neurology* 2001; **433**: 157–182.

[24] LOVENBERG TW, BARON BM, DE LECEA L, MILLER JD, PROSSER RA, REA MA, FOYE PE, RACKE M, SLONE AL, SIEGEL BW, DANIELSON PE, SUTCLIFFE JG, ERLANDER MG. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT_7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 1993; **11**: 449–458.

[25] LU H, OZAWA H, NISHI M, ITO T, KAWATA M. Serotonergic Neurones in the Dorsal Raphe Nucleus That Project into the Medial Preoptic Area Contain Oestrogen Receptor β. *J Neuroendocrinology* 2001; **13**: 839-845.

[26] MANRIQUE C, HÉRY F, FAUDON M, FRANÇOIS-BELLAN AM. Indirect Evidence for an Association of 5-HT_{1B} Binding Sites With Retinal and Geniculate Axon Terminals in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Synapse* 1999; **33**: 314–323.

http://rcin.org.pl

[27] MELONI EG, DAVIS M. Synergistic enhancement of the acoustic startle reflex by dopamine D_1 and 5-HT_{1A} agonists and corresponding changes in c-Fos expression in the dorsal raphe of rats. *Psychopharmacology* 2000; **151**: 359–367.

[28] MEYER-BERNSTEIN EL, MORIN LP. Differential Serotonergic Innervation of the Suprachiasmatic Nucleus and the Intergeniculate Leaflet and its Role in Circadian Rhythm Modulation. *J Nerosci* 1996; **16(6)**: 2097–2111.

[29] MEYER-BERNSTEIN EL, BLANCHARD JH, MORIN LP. The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the suprachiasmatic nucleus modulates activity phase onset, but not other circadian rhythm parameters. *Brain Res* 1997; **755**: 112–120.

[30] MILLER JD, FULLER CA. The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and serotonergic stimulation. *Brain Res* 1990; **515**: 155–162.

[31] MISTLEBERGER RE, ANTLE MC, GLASS JD, MILLER JD. Behavioral and Serotonergic Regulation of Circadian Rhythms. *Biol Rhythm Res* 2000; **31(3)**: 240–283.

[32] MOGA MM, MOORE RY. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1997; **389**: 508–534.

[33] MORIN LP. Serotonergic reinnervation of the hamster suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet without functional circadian rhythm recovery. *Brain Res* 1992; **599**: 98–104.

[34] MORIN LP. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* 1999; **31**: 12–33.

[35] MORIN LP, BLANCHARD J. Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain Res* 1991; **566**: 173–185.

[36] MOYER RW, KENNAWAY DJ, FERGUSON SA, DIJSTELBLOEM YP. Quipazine and light have similar effects on c-*fos* induction in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1997; **765**: 337–342.

[37] PICKARD GE. Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci Lett* 1985; **55**: 211–217.

[38] PICKARD GE, REA MA. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. *Biol Cell* 1997a; **89**: 513–523.

[39] PICKARD GE, REA MA. TFMPP, a $5HT_{1B}$ receptor agonist, inhibits light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm and c-Fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 1997b; **231**: 95–98.

[40] PICKARD GE, SMITH BN, BELENKY M, REA MA, DUDEK FE, SOLLARS P.J. 5-HT_{1B} Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of Retinal Input to the Suprachiasmatic Nucleus. *J Neuroscience* 1999; **19(10)**: 4034–4045.

[41] PROSSER RA. Serotonergic Actions and Interactions on the SCN Circadian Pacemaker: *In Vitro* Investigations. *Biol Rhythm Res* 2000; **31(3)**: 315–339.

[42] PROSSER RA, DEAN RR, EDGAR DM, HELLER HC, MILLER JD. Serotonin and the mammalian circadian system I. *In vitro* phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *J Biol Rhythms* 1993; **8**: 1–16.

[43] PROSSER RA, MILLER JD, HELLER HC. A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei *in vitro*. *Brain Res* 1990; **534**: 336–339.

[44] REA MA, PICKARD GE. Serotonergic Modulation of Photic Entrainment in the Syrian Hamster. *Biol Rhythm Res* 2000a; **31(3)**: 284–314.

[45] REA MA, PICKARD GE. A 5-HT_{1B} receptor agonist inhibits light-induced suppression of pineal melatonin production. *Brain Res* 2000b; **858**: 424–428.

[46] REA MA, GLASS JD, COLWELL CS. Serotonin Modulates Photic Responses in the Hamster Suprachiasmatic Nuclei. *J Neuroscience* 1994; **14(6)**: 3635–3642.

[47] SELIM M, GLASS JD, HAUSER UE, REA MA. Serotonergic inhibition of light-induced fos protein expression and extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 1993; **656**: 302–308.

[48] SHIBATA S, TSUNEYOSHI A, HAMADA T, TOMINAGA K, WATANABE S. Phase-resetting effect of 8-OH-DPAT, a serotonin 1A receptor agonist, on the circadian rhythm of firing rate in the rat suprachiasmatic nuclei *in vitro*. *Brain Res* 1992; **582**: 353–356.

[49] SMART CM, BIELLO SM. WAY-100635, a specific 5-HT1A antagonist, can increase the responsiveness of the mammalian circadian pacemaker to photic stimuli. *Neurosci Lett* 2001; **305**: 33–36.

http://rcin.org.pl

[50] SMITH BN, SOLLARS PJ, DUDEK FE, PICKARD GE. Serotonergic Modulation of Retinal Input to the Mouse Suprachiasmatic Nucleus Mediated by 5-HT_{1B} and 5-HT_7 Receptors. *J Biol Rhythms* 2001; **16(1)**: 25–38.
[51] TANAKA J, OKUMURA T, SAKANAKI K, MIYAKUBO H. Activation of Serotonergic Pathways from the Midbrain Raphe System to the Subfornical Organ by Hemorrhage in the Rat. *Experimental Neurology* 2001; **169**: 156–162.
[52] UEDA S, KAWATA M, SANO Y. Identification of serotonin- and vasopressin immunoreactivities in the suprachiasmatic nucleus of four mammalian species. *Cell Tissue Res* 1983; **234**: 237–248.
[53] UNDERWOOD MD, KHAIBULINA AA, ELLIS SP, MORAN A, RICE PM, MANN JJ, ARANGO V. Morphometry of the Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurons in Suicide Victims. *Biol Psychiatry* 1999; **46**: 473–483.
[54] VAN DEN POL AN, TSUJIMOTO KL. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 1985; **15**: 1049–1086.
[55] WEBER ET, GANNON RL, REA MA. Local Administration of Serotonin Agonists Blocks Light-Induced Phase-Advances of the Circadian Activity Rhythm in the Hamster. *J Biol Rhythms* 1998; **13(3)**: 209–218.
[56] YING S-W, RUSAK B. 5-HT_7 receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* 1997; **755**: 246–254.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 10.07. 2002 r.
Przyjęto: 08.10. 2002 r.
30-060 Kraków, ul. R. Ingardena 6

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (229–241)

WYSTĘPOWANIE I BIOSYNTEZA TRITERPENOIDÓW W WARUNKACH *IN VITRO*

TRITERPENOIDS OCCURRENCE AND THEIR BIOSYNTHESIS IN CULTURES *IN VITRO*

Anna GRZELAK[1], Wirginia JANISZOWSKA[2]

[1]Instytut Parazytologii PAN, [2]Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

Streszczenie: Triterpenoidy są bardzo obszerną grupą związków i występują powszechnie w świecie roślin. Ze względu na cenne właściwości (owadobójcze, grzybobójcze, przeciwwirusowe i inne) coraz większe zainteresowanie budzi sprawna ich biosynteza w kulturach *in vitro*. W niniejszym artykule opisano przykłady biosyntezy fitoekdysteroidów, sapogenin steroidowych i pięciocyklicznych przez komórki różnych roślin utrzymywanych w różnych typach kultury. Dotąd w odróżnicowanych komórkach *in vitro*, jeśli szlak biosyntezy fitoekdysteroidów zachodził w ogóle, otrzymywano niższą ich zawartość niż w tkankach *in vivo*, a tylko sporadycznie ilości tych związków w kulturze *in vitro* były większe (np. w kalusie uzyskanym z przedrośli paproci *Pteridium aquilinum*). Do biosyntezy digitoksyny konieczna była organogeneza, ale w przypadku innych sapogenin steroidowych – pochodnych diosgeniny, w tkance kalusowej bez oznak organogenezy obserwowano dużo większe ich ilości. Podobnie, różne wyniki otrzymano w przypadku biosyntezy sapogenin pięciocyklicznych *in vitro* w zależności od gatunku rośliny, rodzaju kultury, pożywki, stężenia w niej hormonów i składników pokarmowych.

Słowa kluczowe: triterpenoidy, fitoekdysteroidy, sapogeniny, kultura *in vitro*.

Summary: Triterpenoids belong to the large group of plant substances, which occur commonly in plants. Considering their valuable properties (insecticidal, fungicidal, antiviral and others), active biosynthesis of triterpenoids in plant cells *in vitro* enjoys now growing interest. In this review the cases of production of phytoekdysteroids, steroidal and pentacyclic sapogenins by plant cells, in different type of *in vitro* cultures are described. In general, the amounts of phytoekdysteroids were fewer in undifferentiated cells (callus cultures) in comparison to original plants, despite several exceptions (i. e. callus tissue from *Pteridium aquilinum* prothalium). To digitoxin biosynthetic pathway being active in cells, the organogenesis was required. Otherwise, other steroidal sapogenis – diosgenin derivatives – are synthesised more intensively in callus tissues. Similarly, very different results were obtained in pentacyclic sapogenins biosynthesis *in vitro* according to plant species, culture type, medium, hormone and nutrients concentration.

Key words: triterpenoids, phytoekdysteroids, sapogenins, *in vitro* culture.

http://rcin.org.pl

WSTĘP

Triterpenoidy, powstające w wyniku cyklizacji 30-węglowego łańcucha skwalenu, stanowią znaczną część spośród ponad 30 000 ogółem wyizolowanych z roślin i zidentyfikowanych związków izoprenoidowych [14]. Oprócz substancji niezbędnych do życia, np. steroli – elementów strukturalnych każdej błony komórkowej, występuje wśród nich wiele metabolitów wtórnych stanowiących ochronę chemiczną rośliny przed mikroorganizmami chorobotwórczymi i pasożytniczymi, zwierzętami roślinożernymi (głównie owadami) i konkurencyjnymi roślinami. Od czasu opracowania prostszych metod ich ekstrakcji i oczyszczania oraz możliwości określania ich struktury chemicznej [28, 49] wzrasta zainteresowanie tymi związkami jako środkami owadobójczymi [29, 44, 62, 65], grzybobójczymi [63], przeciwmalarycznymi [52], ślimakobójczymi [61], przeciwwirusowymi, np. przeciwko wirusowi Epsteina-Barra [48], HIV [20, 37, 38], jako składnikami kompleksów immunostymulujących (micelle) przy konstruowaniu różnego rodzaju szczepionek [47, 56], a także leków przeciwnowotworowych [5, 16, 23, 24]. Powyższe właściwości triterpenoidów skłaniają do badania regulacji ich metabolizmu i uzyskania sprawnej biosyntezy przez komórki roślinne w kulturze *in vitro* (tab. 1). Dotychczas stosunkowo niewiele jest doniesień o biosyntezie triterpenoidów w warunkach *in vitro* [63], a te, które opisano, dotyczą w dużej części fitoekdysteroidów, sapogenin steroidowych i pięciocyklicznych.

FITOEKDYSTEROIDY

Fitoekdysteroidy stanowią szczególną grupę związków roślinnych wykazujących aktywność hormonów linienia owadów (ekdysony). Do tej pory wyizolowano z roślin ponad 30 związków o działaniu ekdysonów. Wszystkie substancje tego typu zawierają tetracykliczny układ sterydowy z łańcuchem bocznym i licznymi grupami hydroksylowymi (ryc. 1). Wykorzystywane są coraz szerzej w rolnictwie do kontroli rozwoju owadów, zarówno szkodników roślin jak i owadów użytkowych, np. jedwabnika *Bombyx mori,* w celu zwiększenia produkcji jedwabiu [15]. Stwierdzono także właściwości przeciwnowotworowe trzech ekdysteroidów – cyasteronu, polipodiny B i dekumbesteronu – wyizolowanych z *Ajuga decumbens* [66].

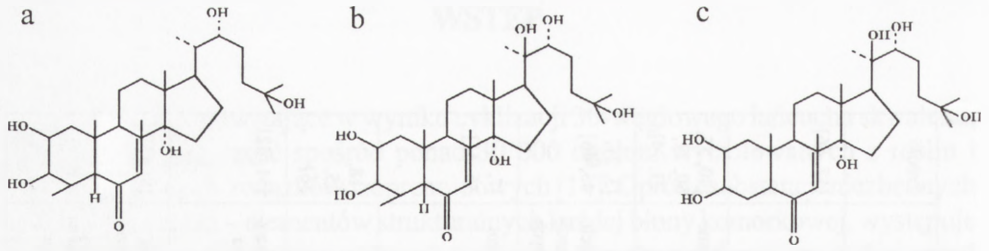
Badania biosyntezy fitoekdysteroidów w komórkach *in vitro* prowadzone są na stosunkowo niewielu gatunkach roślin [4, 10, 29, 40, 67, 70] i w większości opisanych przypadków zawartość tych metabolitów wtórnych jest niższa niż w roślinie. Dla przykładu w tkance kalusowej pochodzącej z liścieni *Achyranthes* sp. [29] ich ilość była śladowa i stanowiła mniej niż 0,002% suchej masy tkanki. Podobnie w kulturach kalusowych i zawiesinowych *Serratula tinctoria* stwierdzono, że w tkankach *in vitro* zawartość ekdysteroidów wahała się od 0,2 do 113 mg/g s. m., podczas gdy w liściach związki te występują w ilości 2,6–6,1 mg/g s.m., w łodygach – 1,2–5 mg/g s.m. i w

http://rcin.org.pl

TABELA 1. Przykłady biosyntezy triterpenoidów w kulturach *in vitro* wybranych gatunków roślin

Roślina	Eksplantat/ zastosowana pożywka	Typ kultury	Występujące triterpenoidy	Właściwości produkowanego triterpenoidu	Źródło
Polypodium vulgare	Zarodniki MS+fitohormony (różne modyfikacje)	Kultury przedrośli (tkanka haploidalna) lub sporofitów (tkanka diploidalna)	Ekdyson i jego pochodne: 5,20-hydroksyekdysonabutasteron, 20-hydroksyekdyson, inokosteron, 24-hydroksyekdyson, pterosteron	5,20-dihydroksyekdyson – przeciwnowotworowe	[57, 66]
Digitalis lanata	Pręciki kwiatowe/ MS+fitohormony (różne modyfikacje)	Embriogeniczne kultury zawiesinowe i kalusowe oraz kultury korzeni włośnikowych	Digoksyna i jej pochodne	Aktywacja pracy serca – stosowane głównie w niewydolności mięśnia sercowego	[40, 55, 60, 72, 73, 74]
Dioscorea sp.	Liścienie,hypokotyle, liście, łodygi/MS lub RT+fitohormony (różne modyfikacje)	Kultury kalusowe i zawiesinowe	Diosgenina	Aktywacja pracy serca, indukcja apoptozy komórek nowotworowych; substraty do produkcji kortykosteroidów i żeńskich hormonów płciowych	[3, 21, 45, 46]
Solanum laciniatum	Liście, łodygi, korzenie, hypokotyle/ LS lub MS+ fitohormony (różne modyfikacje)	Kultury kalusowe bez/oraz z różnicującymi się pędami, kultury zawiesinowe	Solasodyna	Teratogenne, ślimakobójcze,inhibitor cholinoesterazy; substraty do produkcji kortykosteroidów, sterydów i hormonów płciowych	[7, 9, 36, 41]
Agave amaniensis	Młode liście, łodygi/ MS+fitohormony (różne modyfikacje)	Kultury kalusowe i zregenerowane z nich pędy	Hekogenina, kammogenina, gitogenina, tigogenina	Substraty do produkcji kortykosteroidów i środków antykoncepcyjnych	[18, 35, 36]
Aesculus hippocastanum	Liścienie i pierwsze liście młodych roślin/ MS+fitohormony (różne modyfikacje)	Kultury kalusa embriogenicznego i embrioidów	Glikozydy protoescygeniny	Zwiększanie elastyczności i przepuszczalności naczyń krwionośnych, co powoduje poprawę ukrwienia i odżywienia tkanek	[51, 52]
Panax ginseng	Łodygi, ogonki liściowe, korzenie/ MS+fitohormony (różne modyfikacje)	Kultury kalusowe i zawiesinowe oraz kultury transformowanych korzeni włośnikowych	Glikozydy kwasu oleanolowego, panaksadiolu i panaksatriolu	Stymulowanie OUN, przyswajania tlenu przez komórki, obniżanie poziomu cukru i cholesterolu we krwi, zwiększanie odporności organizmu na bakterie, grzyby, wirusy, substancje toksyczne i kancerogeny	[8, 43]

http://rcin.org.pl



RYCINA 1. Wzory wybranych fitoekdysteroidów: a – α-ekdyson, b – 20-hydroksyekdyson, c – ekdysteron (β-ekdyson)

korzeniach – 12–15 mg/mg s.m. [12]. Większe stężenie ekdysteroidów uzyskano, gdy NAA zastąpiono przez 2,4-D w tym samym stężeniu (2 mg/l) [11], a jeszcze większe – przy dodaniu 5 mg 2,4-D/l pożywki. Jednakże, po kilku miesiącach prowadzenia kultury zawiesinowej, biosynteza ekdysteroidów sukcesywnie zanikała aż do zera, co było skorelowane z szybszym przyrostem masy komórek.

W kulturach zawiesinowych *Chenopodium album* zawartość ekdysteroidów spadała z wiekiem subkultury [10]. W fazie logarytmicznej cyklu (7 dzień) ich ilość wynosiła 9–10 mg/g s.m., natomiast w fazie stacjonarnej (20 dzień) – tylko 5–6 mg/g s.m. W przeciwieństwie do kultur zawiesinowych *Serratula tinctoria* [11] komórki *Chenopodium album* zachowały zdolność biosyntezy ekdysteroidów w zawiesinie, chociaż zachodziła ona na znacznie niższym poziomie niż w roślinach (liście – 175, korzenie – 377 mg/g s.m.). Badając jednocześnie biosyntezę steroli (prekursorów ekdysteroidów) autorzy stwierdzili znacznie wyższą ich zawartość w kulturach niż w roślinach, co świadczy o hamowaniu późniejszych etapów biosyntezy ekdysteroidów w tych kulturach [13].

Kłącza paproci *Polypodium vulgare* również zawierają znaczne ilości ekdysonu i jego pochodnych: 20-hydroksyekdysonu oraz 5,20-dihydroksyekdysonu (polipodina B). W roślinach najwięcej występuje 20-hydroksyekdysonu (0,4% s.m.), mniej polipodiny B (0,28% s.m.) i najmniej ekdysonu (0,03% s.m.) [57]. Camps i wsp. [4] wyprowadzili kultury przedrośli *Polypodium vulgare*, a z nich tkankę kalusową. Następnie oznaczyli zawartość ekdysteroidów w obu typach tkanek. W kulturach przedrośli zawartość ekdysteroidów wzrastała wraz z długością okresu jej prowadzenia i po 6 tygodniach stanowiła 0,86% s.m. tkanki, w tym 20-hydroksyekdysonu 0,7%, polipodiny B 0,1% i ekdysonu 0,06%. Autorzy stwierdzili, że większa zawartość 20-hydroksyekdysonu i mniejsza polipodiny B niż w roślinach mogła wynikać z niedokładnego rozdzielenia tych dwóch związków, gdyż oba charakteryzują się podobną polarnością, a co za tym idzie ruchliwością chromatograficzną. Kalus uzyskany z przedrośli nie syntetyzował ekdysteroidów, co wskazywało na zablokowanie układu enzymatycznego odpowiedzialnego za wytwarzanie tych związków w komórkach będących w stadium odróżnicowania. W przypadku innej paproci, *Pteridium aquilinum*, komórki w stadium odróżnicowania w zawiesinie, pochodzącej tak jak w przypadku *Polypodium vulgare* z kalusa gametofitowego, syntetyzowały ekdysteroidy, których ilość w 1 l pożywki wynosiła 35,2 mg, co prawie 20 razy przewyższało ich zawartość w roślinie [70]. Wśród dziewięciu wyizolowanych różnych ekdysteroidów były związki o znanej budowie chemicznej (ekdysteron, 5-β-OH-ekdysteron, ekdyson,

http://rcin.org.pl

ponasteron) oraz inne, niezidentyfikowane. Zbadano przebieg ich biosyntezy w czasie 55-dniowego cyklu wzrostu kultury zawiesinowej i stwierdzono, że w ciągu trzech pierwszych dni subkultury, przy niewielkim przyroście tkanki, wszystkie powstałe ekdysteroidy były wydzielane do pożywki. Między czwartym a trzynastym dniem masa komórek szybko przyrastała wraz z intensywną produkcją badanych związków, które tym razem gromadziły się w komórkach. Od 14. dnia tempo wzrostu komórek obniżyło się i nie uległo zmianie do końca cyklu, natomiast zawartość ekdysteroidów w pożywce sukcesywnie wzrastała [42]. Otrzymane dla kultury *Pteridium aquilinum* wyniki częściowo odzwierciedlają charakter biosyntezy ekdysteroidów *in vivo*, gdyż związki te występują w największych ilościach podczas jej intensywnego wzrostu [30].

Z kolei, w kalusie i kulturach zawiesinowych *Ajuga turkestanica* ilość ekdysteronu była prawie trzykrotnie wyższa (0,11% s.m.) w porównaniu z jego ilością w liściach i korzeniach (0,02–0,04% s.m.), natomiast zawartość drugiego ekdysteroidu, turkesteronu, była taka jak w korzeniach (0,04% s. m.) [42].

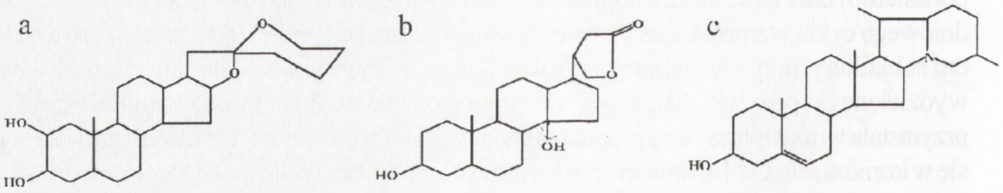
SAPOGENINY STEROIDOWE

Do tej grupy należą związki zawierające tetracykliczany układ sterydowy, gdyż powstają w wyniku różnych przemian z fitosteroli (ryc. 2). Dobrze poznane są pochodne digitogeniny (digitoksygenina, gitoksygenina, digoksygenina, diginatygenina, gitaloksygenina i inne), występujące głównie w formie glikozydów w liściach, w różnych gatunkach *Digitalis*, *Strophanthus*, *Nerium*, *Dioscorea* i *Agave*. Związki te znane są także pod nazwą kardenolidów lub glikozydów nasercowych ze względu na ich właściwość aktywowania pracy serca [71].

Mimo licznych badań nie udało się dotąd uzyskać biosyntezy kardenolidów w odróżnicowanych komórkach *Digitalis*, *Strophanthus* i *Nerium* [50, 72, 73]. W tych trzech przypadkach intensywna biosynteza kardenolidów była ściśle połączona z organogenezą pędów [39, 55, 69]. Kuberski i wsp. [40] stwierdzili, że czynniki sprzyjające tworzeniu się zarodków w kalusie *Digitalis lanata* (np. użycie BA jako cytokininy, 3-krotne podwyższenie stężenia fosforanu, obniżenie o 1/3 zawartości Ca^{+2}, podwyższenie zawartości azotu amonowego w pożywce MS, światło) sprzyjały także powstawaniu digoksyny.

Podobną zależność od stopnia zróżnicowania tkanek stwierdzono w przypadku biosyntezy aglikonów glikoalkaloidów sterydowych (tomatydyna, solanidyna, solamargina), związków występujących głównie w rodzinie *Solanaceae*. Kultury kalusa z różnicującymi się pędami lub korzeniami wytwarzały więcej solasodyny niż kultury kalusowe bez oznak organogenezy [2, 6, 74]. Chandler i Dodds [5] wyprowadzili kultury kalusowe i zawiesinowe z różnych części siewek oraz z liści *Solanum laciniatum* i stwierdzili podobną zawartość solasodyny (0,5–1 mg/g s.m.) w obu typach kultury z tym, że komórki kalusa gromadziły trochę więcej tego związku. Zawartość solasodyny wzrastała po zaidukowaniu tworzenia się pędów i korzeni w kalusie i wynosiła 1,1–3,9

http://rcin.org.pl



RYCINA 2. Wzory wybranych sapogenin steroidowych: a – digitogenina, b – digitoksygenina, c – solanidyna

mg/g s. m., co było porównywalne z jej zawartością w łodygach roślin (1–3 mg/g s. m.). Była to jednak mała ilość w porównaniu do zawartości tego związku w liściach (10–38 mg/g s.m.) i owocach (36 mg/g s.m.). W wielu doniesieniach sugerowano korelację zdolności biosyntezy solasodyny z biosyntezą chlorofilu i specjalizacją komórek [9, 18, 35]. Jednak stwierdzenie obecności solasodyny w kulturach korzeni włośnikowych *Solanum avicculare* w ilości 29–32 mg/g s. m. podważa tę pierwszą sugestię [64].

Interesujące jest, że w kulturach kalusowych *S. wrightii, S. laciniatum* i *S. avicculare* wykrywano pochodne triterpenu – lupanu (kwas betulinowy, betulinę, lupeol i aldehyd lupeolu), które w tych roślinach nie występują [35, 74]. W przypadku *S. avicculare* zawartość kwasu betulinowego była stosunkowo wysoka (ponad 30 mg/g s.m.) i zależała od linii kalusowej.

Sapogeniny steroidowe, takie jak diosgenina, tokorogenina, hekogenina, manogenina itp., obecne były w kulturach odróżnicowanych komórek uzyskanych z roślin, w których związki te występują, a ponadto wydaje się, że warunki kultury nawet sprzyjają biosyntezie tego rodzaju związków. I tak, w odróżnicowanych kulturach *Agave weightii* zawartość sapogenin steroidowych (hekogenina, kammogenina, gitogenina, tigogenina) była dużo wyższa niż w zregenerowanych z nich pędach, a ich ilość wyraźnie zależała od składu pożywki i przy niektórych kombinacjach soli mineralnych i substancji organicznych była nawet wyższa niż w roślinach macierzystych [59]. W kulturach kalusowych *Agave amaniensis* istotne dla wysokiej zawartości sapogenin okazało się usunięcie jonów Ca^{+2} z pożywki, chociaż powodowało to zahamowanie przyrostu masy komórek o połowę [21, 36]. Na pożywce z wyższą zawartością magnezu (5 mM) w porównaniu z pożywką MS o klasycznym składzie (1,5 mM) i bez jonów Ca^{+2} ilość sapogenin była wyższa niż w liściach roślin *Agave amaniensis* (0,04%) i wynosiła 0,058% suchej masy komórek. Podwyższenie stężenia jonów Cu^{+2} również stymulowało produkcję sapogenin do ilości występujących w roślinach (0,041% s. m.). W kulturach kalusowych i zawiesinowych różnych gatunków *Dioscorea* zawartość diosgeniny była niższa lub taka sama jak w roślinie w zależności od użytego gatunku rośliny i rodzaju pożywki [21, 74]. Ciekawe jest, że w kulturach kalusowych *Solanum laciniatum,* mimo że nie wykryto solasodyny, stwierdzono obecność diosgeniny w ilości 0,01% s.m. [69].

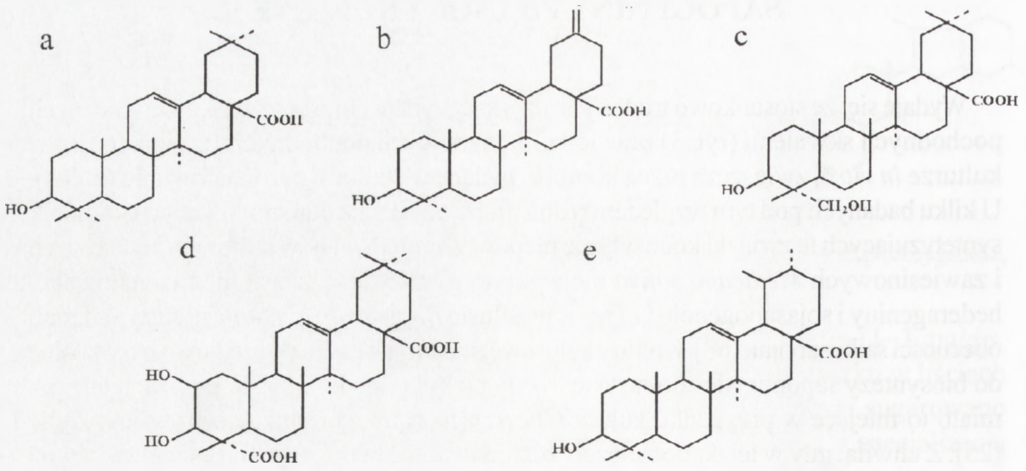
http://rcin.org.pl

SAPOGENINY PIĘCIOCYKLICZNE

Wydaje się, że stosunkowo trudno jest uzyskać wydajną biosyntezę pięciocyklicznych pochodnych skwalenu (ryc.3) oraz ich glikozydowych pochodnych (tzw. saponin) w kulturze *in vitro*, zwłaszcza przez komórki będące w stadium odróżnicowania (kalus). U kilku badanych pod tym względem roślin próby uzyskania odróżnicowanych komórek syntetyzujących te związki kończyły się niepowodzeniem. I tak w kulturach kalusowych i zawiesinowych *Medicago sativa* nie wykryto glikozydów kwasu medikagenowego, hederageniny i sojasapogenolu [17], zaś w kalusie *Bupleurum falcatum* nie stwierdzono obecności saikosaponin [68]. Kultury kalusowe niektórych roślin początkowo były zdolne do biosyntezy saponin, ale zdolność tę traciły po kilku lub kilkunastu pasażach tak, jak miało to miejsce w przypadku kalusa *Glicyrrhiza glabra* produkującego glicyryzynę [25]. Z chwilą, gdy w tej tkance zaczęły różnicować się pędy, pojawiała się glicyryzyna w znacznych ilościach. Z kolei kalus *Gypsophilla repens* tylko przez 4 lata produkował niewielkie ilości (0,03–0,54 mg/g s.m.) glikozydów gipsogeniny [51]. Natomiast w przypadku kalusa *Gypsophilla paniculata* stwierdzono obecność 3-O-glukuronozydu gipsogeniny, którego zawartość wzrastała w miarę prowadzenia kultury, od 1,3 mg/g s.m. po 14 pasażach (1 rok) do 5,7 mg/g s.m. po 49 pasażach, tj. po 4 latach. Okazało się, że istotny wpływ na zawartość tego związku w komórkach miał rodzaj pożywki, na której prowadzono kultury. Wyżej przytoczone ilości występowały w kalusie rosnącym na pożywce B5. Kalus prowadzony na pożywce MS zawierał tylko 0,1 mg/g s.m. po 4 latach od zainicjowania tkanki [51]. W kalusie z różnicującymi się licznymi pędami, także prowadzonym na pożywce MS, poziom 3-O-glukuronozydu gipsogeniny wzrastał z 0,1 do 1,5 mg/g s. m. Były to jednak dużo mniejsze ilości w porównaniu z korzeniami roślin, w których zawartość saponin rosła od 7,5 mg/g s. m. (rośliny roczne) do 40 mg/g s.m. (rośliny czteroletnie) [26]. W dalszych badaniach prowadzonych na kalusie *Gypsophilla paniculata* [26] wykazano, że znakowany prekursor, [2-^{14}C]-octan sodu, włączał się aktywnie do 3-O-glukuronozydu gipsogeniny i steroli przez cały czas trwania inkubacji (72 godz.). Podanie tego glikozydu do kultur na 8 godzin przed podaniem znakowanego octanu powodowało 10-krotne zahamowanie biosyntezy saponin bez widocznego hamowania biosyntezy steroli. Jednocześnie obserwowano 3-krotny wzrost ilości znakowanego skwalenu. Powyższe badania wykazały, że biosynteza triterpenoidowych saponin w komórkach *G. paniculata* regulowana jest przez hamowanie zwrotne, najprawdopodobniej, cyklazy epoksyskwalenu:β-amyryna, czyli na pierwszym etapie tworzenia się pięciocyklicznego szkieletu saponin triterpenowych, przez jeden z końcowych produktów. Niezależność regulacji tego szlaku na poziomie cyklizacji skwalenu po raz pierwszy wykazał Baisted [1] w badaniach nad biosyntezą β-amyryny w zregenerowanych z kalusa roślinach grochu i zasugerował, że ta regulacja powiązana jest z rozwojem rośliny.

W kulturach *Aesculus hipocastanum* zdolność biosyntezy saponin (glikozyd protoescygeniny tzw. escyna) była wyższa niż w roślinach i wyraźnie skorelowana z potencjałem embriogenicznym komórek [53, 54]. W kalusie nieembriogenicznym

http://rcin.org.pl



RYCINA 3. Wzory wybranych sapogenin pięciocyklicznych: a – kwas oleanowy, b – kwas 30-noroleanowy (akebonowy), c – hederagenina, d – kwas medikagenowy, e – kwas ursolowy

zawartość escyny stanowiła 12,2–14,1% s.m., tj. była nieznacznie wyższa od tej w liścieniach (10–11% s.m.) użytych jako eksplantaty, natomiast w kalusie embriogenicznym i w embroidach jej poziom osiągał aż 62–74% s.m. tkanki. Stwierdzono ponadto zmiany zawartości escyny w kalusie embriogenicznym w ciągu okresu subkultury. W fazie aktywnego namnażania się i różnicowania (20. dzień) komórki zawierały 62–70% escyny w suchej masie tkanki, a następnie jej zawartość spadała (50–53% s. m.) w starej, 70-dniowej kulturze utrzymywanej bez pasażu. Generalnie, w miarę prowadzenia kultur ilość escyny spadała i po dwóch latach wynosiła 31–33% s. m. w kulturach pasażowanych na świeżą pożywkę co 25 dni, ale i tak była ciągle 3-krotnie wyższa niż w liścieniach roślin rosnących *in vivo*.

Choi [8] również uzyskał większą zawartość (łącznie 8,78% s.m.) glikozydów pięciocyklicznego kwasu oleanolowego i glikozydów czterocyklicznych alkoholi triterpenowych panaksadiolu i panaksatriolu w odróżnicowanych komórkach kalusa *Panax ginseng* w porównaniu z korzeniami (4,75% s. m.) sześcioletnich roślin (surowiec handlowy). Stwierdzono, że stężenie 2,4-D w pożywce MS, na której prowadzono kultury kalusowe i zawiesinowe, w sposób istotny wpływa na zawartość powyższych związków. W obecności 5 mg/l 2,4-D zawartość badanych związków w kalusie i zawiesinie wynosiła 3,1% s. m., natomiast podwyższenie stężenia tego hormonu (10 mg/l) zwiększało ilość badanych związków w kalusie (5,46% s. m.), zaś wyraźnie obniżało w zawiesinie (2,1% s. m.). Dodatek kinetyny (1 mg/l) do kultur rosnących w obecności 5 mg/l 2,4-D zwiększał zawartość saponin w tkance kalusowej (3,62% s. m), ale obniżał w zawiesinie (1,8% s. m.), natomiast przy stężeniu 10 mg/l 2,4-D podwyższał ilość badanych substancji tak w kalusie (8,78% s. m), jak i w zawiesinie (2,0% s.m.).

http://rcin.org.pl

Również Fujioka i wsp. [19] przebadali wpływ różnych stężeń i rodzajów hormonów na biosyntezę glikozydów kwasu oleanolowego oraz panaksadiolu i panaksatriolu w kulturach kalusowych *Panax japonicum*. Kultury prowadzili na pożywce MS w różnych układach różnych stężeń IAA, IBA i kinetyny. Stwierdzili, że IAA, jako jedyny hormon w pożywce lub w kombinacji z kinetyną, nie zwiększał zawartości saponin. Najwyższą zawartość wynoszącą 18,16% s.m. tkanki uzyskali w obecności 20 mg/l IBA i 0,2 mg/l kinetyny.

Interesujące wyniki otrzymali Sashida i wsp. [58] badając strukturę i zawartość triterpenoidów w roślinach *Actinidia polygama*, wyprowadzonych z nich kulturach kalusowych oraz zregenerowanych roślinach. Stwierdzili, że rośliny zregenerowane *in vitro* i rosnące *in vivo* zawierają te same pochodne kwasu ursolowego. Natomiast w tkance kalusowej brak było jednej pochodnej z grupą hydroksylową przy węglu C-23, ale dodatkowo występowały dwie pochodne tego kwasu z grupą hydroksylową w pozycji C-24, których nie znaleziono w zregenerowanych roślinach i tych rosnących *in vivo*. Uzyskane wyniki wskazują, że komórki kalusa *Actinidia polygama* są zdolne do hydroksylowania grupy metylowej tylko przy węglu C-24 (pozycja β przy węglu C-4) w przeciwieństwie do komórek *in planta*, w których zachodzi hydroksylacja obu grup metylowych przy węglu C-4 (pozycja α i β).

Podobnie w kulturach kalusowych innych roślin stwierdzono obecność nowych związków triterpenoidowych obok tych występujących w roślinach. W przypadku *Akebia quinata* uzyskano kwas 30-noroleanolowy (kwas akebonowy), a *Stauntonia hexaphylla* – kwas akebonowy i 3-epi-akebonowy (również typu 30-noroleananu) [31, 32]. Triterpeny typu 30-noroleananu prawie nie występują w tkankach *in vivo* [31]. Stwierdzono jedynie niewielkie ilości kwasu norarjunolinowego w perykarpie owoców *A. quinata* [27]. Ostatnio w Instytucie Biochemii UW również podjęto próby uzyskania biosyntezy triterpenoidowego kwasu oleanolowego w odróżnicowanych kulturach *in vitro Calendula officinalis*. Kultury kalusowe uzyskane z liścieni 6-dniowych siewek i prowadzone na pożywce MS z dodatkiem 2,4-D i kinetyny lub 2iP zawierały kwas oleanolowy, jednak jego ilość była bardzo mała (0,022–0,162 mg/g św.m.) w porównaniu z ilością tego związku w siewkach (ok. 0,480 mg/g św.m.) oraz w roślinach rosnących *in vivo* (305,7 mg/g św.m.). Podobnie w kulturach zawiesinowych *C. officinalis* otrzymanych z tkanki kalusowej zawartość kwasu oleanolowego była niewielka i zależała od rodzaju i stężenia zastosowanych fitohormonów [22].

Opisano także przypadki aktywnej biosyntezy triterpenoidów w kulturach odróżnicowanych komórek roślin, które nie zawierają tych związków. Ikuta i Itokawa [33] oraz Ikuta i wsp. [34] uzyskali tkanki kalusowe z łodyg *Peonii japonica*, *P. lactiflora* i *P. suffruticosa* zawierające duże ilości różnych triterpenoidów pięciocyklicznych (5–6% s.m. tkanki). Oprócz znanych triterpenoidów, występujących w innych roślinach (kwas oleanolowy, betulinowy, hederagenina i 24-metylocykloartenol), występowały także nowe związki niewykrywane dotąd *in vivo* (kwas 23-hydroksybetulinowy i 30-norhederagenina).

http://rcin.org.pl

PODSUMOWANIE

Z powyższego przeglądu na temat występowania i biosyntezy triterpenoidów w kulturze *in vitro* wyraźnie widać ścisłą zależność prawidłowego funkcjonowania tego szlaku metabolicznego od stanu fizjologicznego komórek. Może to w części wynikać z funkcji, jaką pełnią one w roślinie – biorą udział w rozwoju rośliny lub w jej obronie przed innymi organizmami. Mimo że trudno dopatrzyć się jakichś ogólnych prawidłowości, które sprzyjałyby biosyntezie triterpenoidów w kulturze *in vitro*, jest jednak możliwe określenie niektórych warunków wydajnej biosyntezy powyższych związków dla poszczególnych gatunków czy rodzajów roślin.

PIŚMIENNICTWO

[1] BAISTED DJ. Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seeds. *Biochem J* 1971; **124**: 375–383.

[2] BHATT PN, BHATT DP, SUSSEX I. Studies of some factors affecting solasodine contents in tissue cultures of *S. nigrum*. *Physiol Plant* 1983; **57**: 159–162.

[3] CAI J, LIU M, WANG Z, JU Y. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**:193–196.

[4] CAMPS F, CLAVEIRA E, COLL J, MARCO MP, MESSEGUER J, MELÉ E. Ecdysteroid production in tissue cultures of *Polypodium vulgare*. *Phytochem* 1990; **29**: 3819–3821.

[5] CANDRA E, MATSUNAGA K, FUJIWARA H, MIMAKI Y, SASHIDA Y, YAMAKUNI T, OHIZUMI Y. Two steroidal saponins from *Camassia ensickii* induce L1210 cell death through the apoptotic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; **79**: 953–958.

[6] CHANDLER SF, DODDS JH. Solasodine production in rapidly proliferating tissue cultures of *S. laciniatum* Ait. *Plant Cell Rep* 1983a; **2**: 69–72.

[7] CHANDLER SF, DODDS JH. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasodine in callus cultures of *S. laciniatum*. *Plant Cell Rep* 1983b; **2**: 205–208.

[8] CHOI KT. *Panax ginseng* C. A. Meyer: micropropagation and the *in vitro* production of saponin. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol **4** Medicinal and Aromatic Plants II, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1988: 484–500.

[9] CONNER AJ. Differential solasodine accumulation in photoautotrophic and heterotrophic tissue cultures of *Solanum laciniatum*. *Phytochem* 1987; **26**: 2749–2750.

[10] CORIO-COSTET MF, CHAPUIS L, DELBECQUE JP. *Chenopodium album* L. (Fat Hen): *In vitro* cell culture, and production of secondary metabolites (phytosterols and ecdysteroids). [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 41 Medicinal and Aromatic Plants X, Springer Verlag, Berlin, 1998: 385–401.

[11] CORIO-COSTET MF, CHAPUIS L, DELBECQUE JP. *Serratula tinctoria* L. (Dyer's Savory): *In vitro* culture and the production of ecdysteroids and other secondary metabolites. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 37 Medicinal and Aromatic Plants IX, Springer Verlag, Berlin, 1996: 385–401.

[12] CORIO-COSTET MF, CHAPUIS L, MOUILLET JF, DELBECQUE JP. Sterol and ecdysteroid profiles of *Serratula tinctoria* (L.): plant and cell cultures producing steroids. *Insect Biochem Mol Biol* 1993b; **23**: 175–180.

[13] CORIO-COSTET MF, CHAPUIS L, SCALLA R, DELBECQUE JP. Analysis of sterols in plants and cell cultures producing ecdysosteroids: I. *Chenopodium album*. *Plant Sci* 1993a; **91**: 23–33.

[14] DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS, 2000. Wersja 9.1 (CD-ROM), Chapman i Hall/CRC Press, London, New York.

http://rcin.org.pl

[15] DINAN L. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochem* 2001; **57**: 325–339.
[16] DONG M, FENG XZ, WU LJ, WANG BX, IKEJIMA T. Two new steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* and their cytotoxic activity. *Planta Med* 2001; **67**: 853–857.
[17] EDWARDS R, PARRY AD. *Medicago* species (alfalfa): *In vitro* culture and the production of secondary metabolites. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol **28** Medicinal and Aromatic Plants VII, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1994: 328–345.
[18] EHMKE A, EILERT U. *Solanum dulcamara* L. (bittersweet): accumulation of steroidal alkaloids in the plants and in different *in vitro* systems. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 21 Medicinal and Aromatic Plants IV, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993: 339–350.
[19] FUJIOKA N, KOHDA H, YAMASAKI K, KASAI R, TANAKA O, SHOYAMA Y, NISHIOKA I. Production of oleanane saponins by callus tissue of *Panax japonicum*. *Planta Med* 1989; **55**: 576–577.
[20] FUJIOKA T, KASHIWADA Y, KILKUSKIE RE, COSENTINO LM, BALLAS LM, JIANG JB, JANZEN WP, CHEN IS, LEE KH. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod* 1994; **57**: 243–247.
[21] FURMANOWA M, GUZEWSKA J. *Dioscorea*: *In vitro* culture and the micropropagation of diosgenin-containing species. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 7 Medicinal and Aromatic Plants II, Springer Verlag, Berlin, 1989: 162–184.
[22] GRZELAK A, JANISZOWSKA W. Initiation and growth characteristics of cultures of *Calendula officinalis* cells: I. Changes in the level of oleanolic acid during the cell growth cycle of culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 2002; **71**: 29–40.
[23] GU JQ, PARK EJ, LUYENGI L, HAWTHORNE ME, MEHTA RG, FARNSWORTH NR, PEZZUTO JM, KINGHORN AD. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventative activity. *Phytochem* 2001; **58**: 121–127.
[24] HANAUSEK M, GANESH P, WALASZEK Z, CHARLES J, ARNTZEN, SLAGA TJ, GUTTERMAN JU. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; **98**: 11551–11556.
[25] HENRY M, EDY AM, DESMAREST P, Du MANOIR J. *Glycyrrhiza glabra* L. (Licorice): Cell culture, regeneration and production of glycyrrhizin. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol **7** Medicinal and Aromatic Plants III, Springer Verlag, Berlin, 1989: 270–282.
[26] HENRY M. *Gypsophilla paniculata* L. (baby's breath): *In vitro* culture and the production of gypsogenin saponins. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol **21** Medicinal and Aromatic Plants IV, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993: 187–206.
[27] HIGUCHI R, KAWASAKI T. Pericarp saponins of *Akebia quinata* Decne. II. Arjunolic and norarjunolic acids and their glycosides. *Chem Pharm Bull* 1976; **24**: 1314.
[28] HIGUCHI R, TOKIMITSU Y, FUJIOKA T, KOMORI T, KAWASAKI T, OAEKENFUL DG. Structure of desacylsaponins obtained from bark of *Quillaja saponaria*. *Phytochem* 1987; **26**: 229–235.
[29] HIKINO H, JIN T, TAKEMOTO T. Occurrence of insect-moulting substances ecdysterone and inokosterone in callus tissues of *Achyranthes*. *Chem Pharm Bull* 1971; **19**: 439–440.
[30] HIKITO H, OKUYAMA T, JIN T, TAKEMOTO T. Screening of japanese ferns for phytoecdysones. *Chem Pharm Bull* 1973; **21**: 2292–2302.
[31] IKUTA A, ITOKAWA H. 30-Noroleanane saponins from callus tissues of *Akebia quinata*. *Phytochem* 1989; **28**: 2663–2665.
[32] IKUTA A, ITOKAWA H. Triterpenoids of *Akebia quinata* callus tissues. *Phytochem* 1986; **25**: 1625–1628.
[33] IKUTA A, ITOKAWA H. Triterpenoids of *Peonia japonica* callus tissue. *Phytochem* 1988b; **27**: 2813–2815.
[34] IKUTA A, KAMIYA K, SATAKE T, SAIKI Y. Triterpenoids from callus tissue of *Paeonia* species. *Phytochem* 1995; **38**: 1203–1207.
[35] INDRAYANTO G, SONDAKH R, SYAHRANI A, UTAMI W. *Solanum mammosum* L. (terong susu): *In vitro* culture and the production of steroidal alkaloids and other secondary metabolites. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 41 Medicinal and Aromatic Plants X, Springer Verlag, Berlin, 1998: 394–414.

http://rcin.org.pl

[36] INDRAYANTO G, UTAMI W, SYAHRANI A. *Agave amaniensis* Trel & Nowell: *In vitro* culture and production of phytosteroids. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 37 Medicinal and Aromatic Plants IX, Springer Verlag, Berlin, 1996: 1–15.

[37] ITO J, CHANG FR, WANG HK, PARK YK, IKEGAKI M, KILGORE N, LEE K.H. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J Nat Prod* 2001; **64**: 1278–1281.

[38] KASHIWADA Y, WANG HK, NAGAO T, KITANAKA S, YASUDA I, FUJIOKA T, YAMAGISHI T, COSENTINO LM, KOZUKA M, OKABE H, IKESHIRO Y, HU CQ, YEH E, LEE KH. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *J Nat Prod* 1998; **61**: 1090–1095.

[39] KAWAGUCHI K, HIROTANI M, FURUYA T. *Strophanthus* species (members of the dogbane family): *In vitro* culture and production of cardenolides. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 21 Medicinal and Aromatic Plants IV, Springer Verlag, Berlin, 1993: 370–376.

[40] KUBERSKI CH, SCHEIBNER H, STEUP C, DIETTRICH B, LUCKNER M. Embriogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanata*. *Phytochem* 1984; **23**: 1407–1412.

[41] MACEK TE. *Solanum aviculare* Forst., *Solanum laciniatum* Ait. (Poroporo): [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 7 Medicinal and Aromatic Plants II, Springer Verlag, Berlin, 1989: 434–447.

[42] MACĚK T, VANĚK T. *Pteridium aquilinum* L. Kuhn (Bracken Fern): *In vitro* culture and production of ecdysteroids. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 26 Medicinal and Aromatic Plants VI, Springer Verlag, Berlin, 1994: 299–315.

[43] MALLOL A, CUSIDO RM, PALAZON J, BONFILL M, MORALES C, PINOL MT. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochem* 2001; **57**: 365–371.

[44] MARQUINA S, MALDONADO N, GARDUNO-RAMIREZ ML, ARAND E, VILLAREAL ML, NAVARRO V, BYE R, DELGADO G, ALVAREZ L. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. *Phytochem* 2001; **56**: 93–97.

[45] MENTHA AR, STABA EJ. Presence of diosgenin in tissue cultures of *Dioscorea composita* Hemsl. and related species. *J Pharm Sci* 1970; **59**: 864–870.

[46] MOALIC S, LIAGRE B, CORBIERE C, BIANCHI A, DAUCA M, BORDJI K, BENEYTOUT JL. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Lett* 2001; **506**: 225–230.

[47] MOREIN B, SUNDGUIST B, HÖGLUND S, DALSGAARD K, OSTERHAUS A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 1984; **308:** 457–460.

[48] OHIGASHI H., TAKAMURA H., KOSHIMIZU K., TOKUDA H., ITO Y. Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradekanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from the anti-inflamatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederacea* L. *Cancer Lett* 1986; **30**: 143.

[49] OSHIMATA Y, OHSAWA T, OIKAWA K, KONNO C, HIKINO H. Structures of Dianosides A and B, analgesic principles of *Dianthus superbus var. longicalycinus* herbs. *Planta Med* 1984: 40–43.

[50] PAPER DH, FRANZ G. *Nerium* spp.: *In vitro* culture and the production of secondary metabolites. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 21 Medicinal and Aromatic Plants IV, Springer Verlag, Berlin, 1993: 232–248.

[51] PAUTHE-DAYDE D, ROCHD M, HENRY M. Triterpenoid saponin production in callus and multiple shoot cultures of *Gypsophilla* sp. *Phytochem* 1990; **29**: 483–487.

[52] PAVANAD K, WEBSTER HK, YONGVANITCHIT K, KUN-ANAKE A, DECHATIWONGSE T, NUTAKUL W, BANSIDDHI J. Schizontocidal activity of *Celastrus paniculatus* wild against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Phytotherapy Research* 1989; **3**: 136–139.

[53] PROFUMO P, CAVIGLIA AM, GASTALDO P, DAMERI RM. Aescin content in embryogenic callus and in embroids from leaf explants of *Aesculus hippocastanum*. *Planta Med* 1991; **57**: 50–52.

[54] PROFUMO P, GASTALDO P, MARTINICCI R. Variations in aescin content in *Aesculus hippocastanum* seeds during the year. *Fitoterapia* 1987a; **58**: 184–186.

[55] RÜCKER W. *Digitalis* sp.: *In vitro* culture, regeneration and the production of cardenolides and other secondary producst. [w] Bajaj YPS [red.] Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 4 Medicinal and Aromatic Plants I, Springer Verlag, Berlin, 1988: 388–418.

[56] RÖNNERBERG B, FEKADU M, MOREIN B. Adjuvant activity of non-toxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine* 1995; **13**: 1375–1382.

http://rcin.org.pl

[57] REIXACH N, IRURRE-SANTILARI J, CASAS J, MÉLE E, MESSEGUER J, CAMPS F. Production and biosynthetic studies of ekdysteroid in *in vitro* cultures of *Polypodium vulgare*. *Phytochem* 1996; **43**: 597–602.
[58] SASHIDA Y, OGAWA K, YAMANOUCHI T, TANAKA H, SHOYAMA Y, NISHIOKA I. Triterpenoids from callus tissue of *Actinidia polygama*. *Phytochem* 1994; **35**: 377–380.
[59] SHARMA OP, KHANNA P. Studies on steroidal sapogenins from tissue cultures of *Agave weightii*. *Lloydia* 1980; **43**: 459–462.
[60] SEIDEL S, REINHARD E. Major cardenolide glycosides in embriogenic suspension cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Med* 1987; **53**: 308–309.
[61] SLACANIN I, MARSTON A, HOSTETTMANN K. High-performance liquid chromatographic determination of molluscicidal saponins from *Phytolacca dodecandra* (*Phytolaccaceae*). *J Chromatogr* 1988; **448**: 265–274.
[62] SOULÉS S, GÜNTNER C, VAZQUES A, ARGANDONA V, MOYNA P, FERREIRA F. An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. *Phytochem* 2000; **55**: 217–222.
[63] STABA EJ. Secondary metabolism and biotransformation. [w] Staba EJ [red.] Plant tissue as a source of biochemicals. CRC Boca Raton 1980: 73.
[64] SUBROTO MA, DORAN PM. Production of steroidal alkaloids by hairy roots of *Solanum avicculare* and the effect of gibberelic acids. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1994; **38**: 93–102.
[65] SUPRATMAN U, FUJITA T, AKIYAMA K, HAYASHI H. Insecticidal compounds from *Kalanchoe daigremontiana x tubiflora*. *Phytochem* 2001; **58**: 311–314.
[66] TAKASAKI M, TOKUDA H, NISHINO H, KONOSHIMA T. Cancer chemopreventative agents (antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*. *J Nat Prod* 1999; **62**: 972–975.
[67] TOMÂS J, CAMPS F, COLL J, MELÉ E, MESSENGUER J. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue cultures. *Phytochem* 1993; **32**: 317–324.
[68] UOMORI A, SEO S, TOMITA Y. Studies on the constituents in tissue cultures of *Bupleurum falcatum* L. *Shoyakugaku Zasshi* 1974; **29**: 152–160.
[69] VÁGÚJFALVI D, MARÚTI M, TÉTÉNYI P. Presence of diosgenin and absence of solasodine in tissue cultures of *S. laciniatum*. *Phytochem* 1971; **10**: 1389–1390.
[70] VANĚK T, MACEK T, VAISAR T, BREZNOVITS A. Production of ecdysteroid by plant cell culture of *Pteridium aquilinum*. *Biotechnol Lett* 1990; **12**: 727–730.
[71] WANG J, VELOTTA JB, MCDONOUGH AA, FARLEY RA. All human Na(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **281**: 1336–1343.
[72] WYSOKIŃSKA H, CHMIEL A. Biotransformacje w kulturach komórek roślinnych. Część I – Reakcje biotransformacji. *Biotechnologia* 1995; **28**: 114–130.
[73] WYSOKIŃSKA H. Produkcja metabolitów wtórnych w transformowanych kulturach roślin leczniczych. *Zesz Nauk Akad Roln Krak*, Nr 318, Sesja Nauk, z. 50, Kraków 1997: 87–98.
[74] YOSHIMATSU K, SATAKE M, SHIMOMURA K, SAWED JI, TERAO T. Determination of cardenolides in hairy root cultures of *D. lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Nat Prod* 1990; **53**: 1498–1502.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 13.05.2002 r.
Przyjęto: 14.10. 2002 r.
Twarda 51/55, 00-818 Warszawa,
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: wjanisz@biol.uw.edu.pl

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (243–258)

WPŁYW DOJRZEWANIA MITOCHONDRIALNYCH TRANSKRYPTÓW ROŚLIN NA ICH STABILNOŚĆ

THE INFLUENCE OF THE 3' END PROCESSING OF PLANT MITOCHONDRIAL TRANSCRIPT ON THEIR STABILITY

Katarzyna Dorota RACZYŃSKA, Halina AUGUSTYNIAK

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

Streszczenie: Transkrypty mitochondrialnych genów, zanim w pełni przekształcą się w dojrzały mRNA, podlegają kilku modyfikacjom potranskrypcyjnym, do których należy wycinanie intronów, redagowanie oraz obróbka 3' i 5' końca transkryptów. Procesy potranskrypcyjne prowadzące do powstania dojrzałych, funkcjonalnych mRNA są regulowane przez czynniki, które stabilizują bądź degradują te cząsteczki. Poziom stabilnych mitochondrialnych RNA jest związany w pierwszym rzędzie z aktywnością transkrypcyjną genu, na którą wpływa między innymi budowa promotora i liczba kopii genu. Za czynnik stabilizujący mitochondrialne transkrypty przyjmuje się obecność na 3' końcu RNA sekwencji odwrotnie powtórzonych tworzących struktury pętli. Natomiast czynnikiem degradującym mitochondrialny mRNA roślin jest dołączanie ogonów poliadenylowych do 3' końca, co zwiększa podatność transkryptu na działanie nukleaz i indukuje degradację cząsteczek RNA. Mitochondrialne RNA nie wykazują obecności specyficznych elementów sekwencji ściśle związanych z poliadenylacją. W pracy omawiany jest wpływ dojrzewania 3' końca na stabilność i degradację transkryptów mRNA w mitochondriach roślin.

Słowa kluczowe: mitochondrialne transkrypty roślin, poliadenylacja, sekwencje odwrotnie powtórzone.

Summary: Primary mitochondrial transcripts undergo several post-transcriptional processes like splicing, editing and 3'/5' ends processing before become mature RNAs. In other words, the post-transcriptional processes leading to mature RNA molecules are regulated by factors which exert stabilizing or degradating effect on RNA. The steady state level of plant mitochondrial RNAs is determined primarily by the transcription rate, which is influenced by the promoter structure and the gene copy number. It is suggested that the factor stabilizing mitochondrial transcripts is an RNA stem loop structure, encoded by inverted repeats present in the 3' untranslated region of many genes. In turn, the attachment of poly(A) tails to the 3'end of mitochondrial transcripts enhances their degradation by accelerating nuclease action. Mitochondrial RNAs do not display conservative sequence elements closely connected with polyadenylation. This article focuses on the influence of the 3'end processing of plant mitochondrial RNA on their stability and degradation.

http://rcin.org.pl

Key words: plant mitochondrial transcripts, polyadenylation, inverted repeats.

WPROWADZENIE

Cechą charakterystyczną mitochondrialnego genomu roślin jest jego znaczna wielkość oraz zmienność budowy. W przypadku mitochondrialnego DNA roślin wyższych mamy również do czynienia z dużym zróżnicowaniem wielkości cząsteczek DNA; na przykład najmniejszy genom *Brassica hirta* zawiera 208 kpz, a największy *Cucumis melo* – 2400 kpz [5]. Forma, w jakiej występuje mitochondrialny DNA roślin, jest przedmiotem dyskusji. Większość badaczy zakłada występowanie cząsteczki kolistej, zwanej chromosomem głównym, obejmującej całą sekwencję mitochondrialnego DNA oraz kilku mniejszych, subgenomowych cząsteczek zawierających określoną część informacji genetycznej. Inni badacze dostarczają dowodów przemawiających za występowaniem także skomplikowanych, rozgałęzionych liniowych cząsteczek DNA [5]. Cechą charakterystyczną genomu mitochondrialnego roślin jest obecność dużej liczby długich i krótkich sekwencji powtórzonych. Są one zazwyczaj aktywne rekombinacyjnie i wpływają bądź na powstawanie wielocząsteczkowej struktury mitochondrialnego DNA, bądź nowych form występujących w ilościach śladowych, zwanych sublimonami [29, 30]. Intensywne badania genomów mitochondrialnych prowadzone w ostatnich dwóch dziesięcioleciach doprowadziły do poznania całkowitej sekwencji genomu mitochondrialnego między innymi następujących roślin: *Chlamydomonas reinhardtii* (15,7 kpz), *Chondrus crispus* (25,8 kpz), *Rhodomonas salina* (48 kpz), *Prototheca wickerhamii* (55,3 kpz), *Marchantia polymorpha* (186,6 kpz), *Beta vulgaris* (368,8 kpz), *Arabidopsis thaliana* (366,9 kpz), [33, 44, 51, 53]. Poznanie sekwencji całych genomów trzech roślin wyższych pozwoliło potwierdzić dane uzyskane z wcześniejszych badań, iż sekwencje kodujące mitochondrialnego DNA dotyczą około 30 białek i około 20 cząsteczek tRNA oraz trzech rRNA, co stanowi średnio tylko 10% całego genomu. Pozostałe 30% stanowią sekwencje powtórzone, pseudogeny, introny oraz fragmenty sekwencji przeniesionych z jądra i chloroplastów, natomiast około 60% sekwencji genomu mitochondrialnego roślin nie udało się na razie przypisać żadnej funkcji [30, 33]. Liczne rearanżacje genomu mitochondrialnego roślin, specyficzna budowa niektórych genów oraz złożone procesy dojrzewania i obróbki transkryptów są również przyczyną trudności w interpretacji obrazu transkryptów tego genomu.

W transkrypcję genów mitochondrialnych roślin zaangażowane są polimerazy RNA typu fagowego, które są kodowane w jądrze komórkowym. U rzodkiewnika zidentyfikowano trzy takie polimerazy RNA. Jedna z nich kierowana jest do mitochondriów, druga do chloroplastów, trzecia może być przenoszona do obu tych organelli [26]. Ciekawe, że chloroplastowa polimeraza kodowana przez jądro (NEP polimeraza) rozpoznaje promotory wykazujące podobieństwo do mitochondrialnych promotorów, to znaczy zawierających motyw sekwencji 5` YRTA 3` [27]. W odróżnieniu od

http://rcin.org.pl

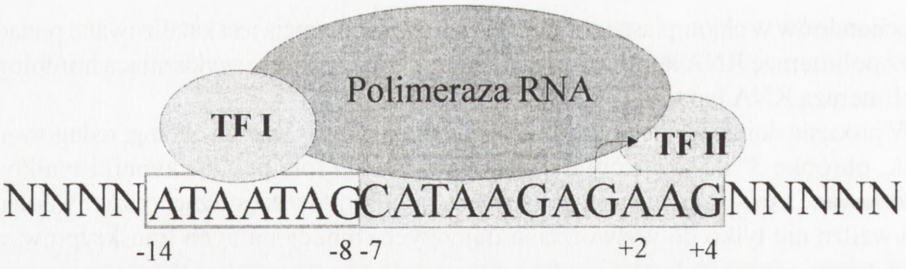
mitochondriów w chloroplastach roślin wyższych transkrypcja jest katalizowana ponadto przez polimerazę RNA kodowaną przez genom organellowy i wykazującą homologię z polimerazą RNA bakterii [18, 28].

W procesie dojrzewania transkryptów, obejmującym *cis* i *trans* splicing, redagowanie RNA, obróbkę 3' i 5' końców transkryptów, istotną rolę pełnią czynniki białkowe importowane z cytosolu. Procesy dojrzewania transkryptów często zachodzą równolegle i prowadzą nie tylko do wytworzenia dojrzałych, funkcjonalnych transkryptów, ale biorą także udział w kontrolowaniu ich stabilnego poziomu. Okazało się, że na utrwalenie się określonego poziomu transkryptów wpływają czynniki zarówno stabilizujące, jak i degradujące.

Liczba pojawiających się transkryptów zależy natomiast w dużej mierze od budowy promotorów. Promotory mitochondrialnych genów roślin oraz miejsca inicjacji transkrypcji zostały już częściowo poznane. Między innymi poznano sekwencję rejonu promotorowego dla genów *atp1, cox2* pszenicy, *atp1*, *cox2, cox3* kukurydzy oraz *atp1*, *atp9* grochu [28]. Okazało się, że w rejonie promotorowym w pozycji –7 do +5 w stosunku do miejsca inicjacji transkrypcji (pozycja +1 oznacza pierwszy transkrybowany nukleotyd) występuje często charakterystyczny motyw sekwencji 5' CRTA 3' (R oznacza purynę), który w wielu przypadkach poprzedzony jest guaniną lub tyminą. Stwierdzono ponadto, że sekwencja zlokalizowana w pobliżu pozycji -11/-12 zawiera istotne nukleotydy, których mutacje wywołują największy hamujący wpływ na aktywność transkrypcyjną [13, 28]. Motyw 5' CRTA 3' występuje w większości poznanych dotychczas mitochondrialnych promotorach roślin. W promotorach genów wielu roślin dwuliściennych motyw CRTA wchodzi w skład dłuższej sekwencji: 5' CRTAaGaGA 3'. Zarówno w obrębie tej sekwencji, jak i w rejonach ją oskrzydlających zlokalizowano wysoce zachowawcze nukleotydy o istotnym znaczeniu dla procesu transkrypcji [6, 28]. Porównując wiele różnych promotorów genów w komórkach wiesiołka, grochu, soi i ziemniaka, stwierdzono, że w obrębie 18-nukleotydowego motywu sekwencji promotora od strony 5' sekwencji CRTA znajduje się kaseta AT, a od strony 3' motyw bogaty w puryny (ryc. 1) [13, 18]. Stwierdzono także, że delecja kilku nukleotydów w obrębie tego 18-nukleotydowego motywu zaburza funkcję promotora [6]. W promotorach genów mitochondrialnych roślin jednoliściennych wykryto również występowanie zbliżonych motywów sekwencji typu: TRTA, YRTA, YYTA, ARTA [13].

Struktura mitochondrialnych promotorów pomimo występowania charak-terystycznych motywów sekwencji nie wydaje się być wysoce zachowawcza nawet w przypadku roślin blisko spokrewnionych [13]. Oprócz genów zawierających w promotorach określone motywy sekwencji, znane są geny, np. gen *trn S* lub *rrn26* ziemniaka, których promotory nie zawierają takich motywów [6, 13, 46]. Wskazuje to, że w mitochondrialnych genach roślin funkcjonują promotory o różnej budowie oraz prawdopodobnie występują różne białkowe czynniki je rozpoznające [13, 42]. W mitochondriach niektórych roślin oszacowano również ilość promotorów występujących w całym genomie. Na przykład, w mitochondrialnym DNA wiesiołka wykryto około 15 aktywnych promotorów [18], a u rzodkiewnika – 29 [28]. Wykryto także, że jeden gen może być transkrybowany z

http://rcin.org.pl



RYCINA 1. Budowa promotora genów mitochondrialnych roślin dwuliściennych. TFI, TFII oznaczają czynniki transkrypcyjne znane dla grzybów, ale jeszcze niepoznane u roślin (wg [28], zmodyfikowano)

kilku różnych promotorów. Na przykład, gen *atp9* kukurydzy ma 6 oddzielnych miejsc inicjacji transkrypcji, inny gen tej rośliny *cox3* ma 3 takie miejsca, podczas gdy dla genu *cox2* stwierdza się występowanie wielu miejsc inicjacji transkrypcji [18, 28]. Sugeruje się również, iż dłuższe, silniejsze promotory, jak na przykład te, leżące przed genami rRNA kukurydzy, zwiększają aktywność procesu transkrypcji [14].

Okazało się także, że poziom poszczególnych stabilnych transkryptów nie zawsze odzwierciedla aktywność transkrypcyjną danych genów. Stwierdzono na przykład, że w mitochondriach kukurydzy geny rRNA są transkrybowane około 5–10 razy częściej niż geny *atp1, atp6* czy *cox2* i jak oczekiwano, poziom stabilnych (*steady-state*) transkryptów rRNA był 5–10 razy wyższy [14]. W komórkach rzodkiewnika wykryto natomiast, że geny rRNA są transkrybowane z taką samą aktywnością jak geny białkowe, a mimo to poziom stabilnych transkryptów rRNA był znacznie wyższy niż odpowiednich mRNA. Uważa się, że jest to wynikiem faktu, że transkrypty genów rRNA są bardziej stabilne i wolniej ulegają degradacji [19]. W komórkach rzodkiewnika zaobserwowano także, iż mimo różnic w aktywności transkrypcji niektórych ramek odczytu, czy nawet różnic między genami podjednostek jednego kompleksu białkowego, poziom stabilnych transkryptów w obu przypadkach jest raczej wyrównany [28]. Ciekawe, że podobny wynik uzyskano analizując transkrypcję w chloroplastach. Na przykład w przypadku genu *rbcL* chloroplastów tytoniu wykryto, że poziom stabilnych transkryptów tego genu jest podobny u roślin rosnących tak w warunkach oświetlenia, jak i zaciemnienia, mimo że częstość transkrypcji genu w roślinach wystawionych na światło była 10-krotnie wyższa [50]. Fakty te przyczyniły się do wysnucia wniosku, że regulacja poziomu transkryptów odbywa się na etapie procesów potranskrypcyjnych, przed rozpoczęciem translacji [19], a poziom stabilnych, mitochondrialnych RNA jest wynikiem aktywności transkrypcyjnej, która może być zależna od budowy promotora i liczby kopii genu oraz procesów modyfikacji potranskrypcyjnych [14, 28].

http://rcin.org.pl

WPŁYW SEKWENCJI ODWROTNIE POWTÓRZONYCH ZLOKALIZOWANYCH NA 3' KOŃCU GENU NA STABILNOŚĆ TRANSKRYPTÓW

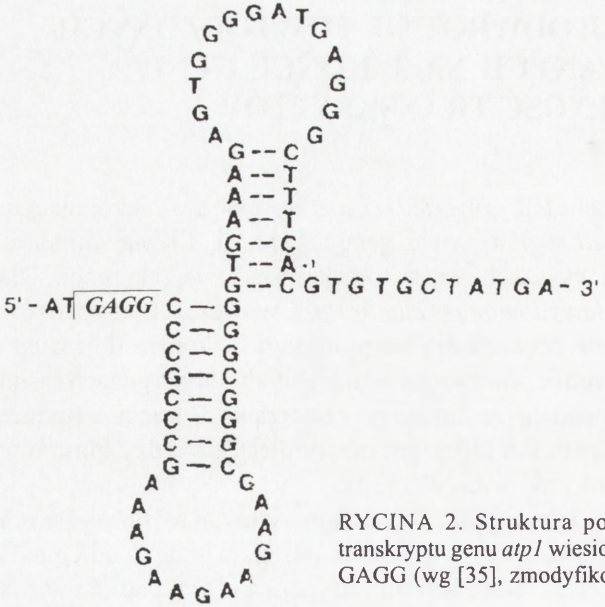
Sekwencje odwrotnie powtórzone (IR – *inverted repeat*) występują w niekodującym regionie 3' (UTR – *untranslated region*) wielu genów bakterii, *Chlamydomonas reinhardtii,* chloroplastów roślin wyższych oraz mitochondriów zwierząt i roślin. Dla przykładu, w chloroplastach *Chlamydomonas reinhardtii* w większości przypadków sekwencje odwrotnie powtórzone poprzedzają bezpośrednio 3' koniec dojrzałego transkryptu [47]. Sekwencje odwrotnie powtórzone w mitochondrialnych genach roślin obejmują 4–7 nukleotydów i powodują, że transkrypty tworzą na 3' końcu strukturę drugorzędową w postaci jednej pętli lub kilku, jak ma to miejsce między innymi w transkrypcie genu *atp9* grochu lub *atp1* wiesiołka [35].

Położenie struktur typu pętli w transkryptach mitochondrialnych roślin wyższych może być różne. Na przykład, transkrypt *atp9* ziemniaka zawiera pętlę w odległości 67–71 nukleotydów powyżej miejsca terminacji transkrypcji, a w przypadku mRNA genu *cox2* grochu struktura pętli znajduje się tylko kilka nukleotydów powyżej 3' końca, natomiast 3' koniec transkryptu genu *atp9* grochu znajduje się tuż za pętlą [10, 17, 34]. W komórkach rzepaku natomiast 3' koniec transkryptu *orf138* znajduje się 20 nukleotydów poniżej struktury pętli [4].Okazało się, że w wielu mitochondrialnych genach roślin pierwszą pętlę poprzedza motyw sekwencji 5' GAGG 3' (ryc. 2) [10].

Ostatnio, na 3' końcu transkryptu genu *cox2* grochu wykryto także sekwencje, które mogą tworzyć dwie alternatywne w budowie pojedyncze struktury pętli [34, 55]. W tym przypadku posłużono się techniką CR RT-PCR (*circular RNA RT-PCR*), która pozwala na amplifikowanie fragmentów transkryptów z kompletnymi 3' i 5' końcami z kolistych cząsteczek RNA, które uzyskano w wyniku ligacji z udziałem T4 RNA ligazy. Takie produkty nie są wykrywalne z użyciem tradycyjnych technik PCR, co może wskazywać, że zligowane końcami 3' i 5' mRNA nie występują w puli stabilnych cząsteczek RNA. Wspomniane powyżej struktury pętli znajdowały się w rejonie 300-nukleotydowej sekwencji położonej za kodonem stop tego genu, a 3' koniec tego transkryptu zlokalizowano w obrębie 9 nukleotydów tymidynowych położonych za pętlą (ryc. 3). Takie położenie struktury pętli przypomina prokariotyczne terminatory transkrypcji i może sugerować, że te 3' końce RNA wywodzą się z miejsc terminacji transkrypcji [34].

Badania nad transkrypcją genów *atp9* grochu, *atp1* wiesiołka oraz *cob1* ryżu wykazały, że obecność pętli nie wpływa na terminację procesu transkrypcji, a działa raczej jako element stabilizujący i sygnalny w procesie obróbki transkryptów. W przypadku genów *cob* ryżu zauważono, że obecność lub brak sekwencji odwrotnie powtórzonych skorelowany jest z różną obfitością stabilnych transkryptów [10, 17, 28]. Stwierdzono również, że istotnym czynnikiem w rozpoznawaniu pętli przez nukleazy nie jest struktura pierwszorzędowa sekwencji powtórzonej, ale raczej struktura drugorzędowa [10].

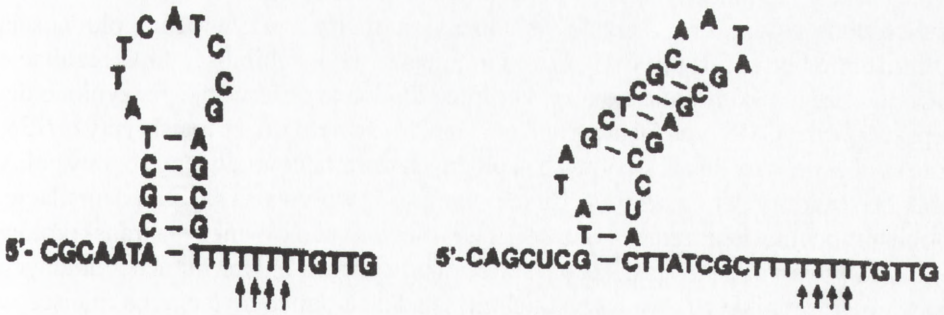
http://rcin.org.pl



RYCINA 2. Struktura podwójnej pętli obecna na 3' końcu transkryptu genu *atp1* wiesiołka. Kursywą wyszczególniono motyw GAGG (wg [35], zmodyfikowano)

Doświadczenia przeprowadzone przez grupę S. Bindera [10] wykazały, że transkrypty genów mitochondrialnych roślin bez sekwencji odwrotnie powtórzonych albo pozostają stabilne, albo są bardzo szybko degradowane. Obecność pętli w transkrypcie powoduje, że degradowana jest sekwencja położona poniżej 3' końca pętli, pozostawiając samą pętlę nienaruszoną. Autorzy tych badań sądzą, że struktura pętli prawdopodobnie zwiększa dostępność transkryptu dla RNAzy lub nawet wiąże RNAzę, tym samym zmniejszając jej działalność i chroniąc sekwencję położoną powyżej pętli, a indukując destabilizację sekwencji rejonu 3' położonego poniżej pętli. W chloroplastach pętle stabilizują transkrypty pełniąc jedynie funkcję sygnałową i pośrednicząc we właściwie prowadzonej obróbce mRNA [47]. W genach bakteryjnych sekwencje odwrotnie powtórzone pełnią funkcję związaną z terminacją transkrypcji, natomiast w mitochondriach zwierząt pętle działają jako regulatory terminacji transkrypcji [10, 18, 28]. W przypadku *Chlamydomonas* i chloroplastów roślin wykazano także, że struktury pętli stabilizują sekwencję położoną powyżej pętli oraz wchodzą w interakcje z kompleksami enzymatycznymi zawierającymi egzo- i endonukleazy wymaganymi do obróbki 3' końca [24, 25]. Okazało się również, że transkrypty z sekwencjami odwrotnie powtórzonymi inkubowane z ekstraktami białkowymi z chloroplastów pozostają stabilne przez wiele godzin, natomiast transkrypty bez powtórzonych sekwencji w tych samych warunkach podlegają natychmiastowej degradacji. Rott i inni [47] stwierdzili, że usunięcie sekwencji odwrotnie powtórzonych w rejonie 3' UTR genu *atpB Chlamydomonas reinhardtii* w rezultacie obniżyło akumulację transkryptu *atpB* i odpowiedniej podjednostki chloroplastowej ATPazy, doprowadzając w rezultacie do zmniejszonej aktywności fotosyntetycznej komórki.

http://rcin.org.pl



RYCINA 3. Potencjalne struktury drugorzędowe utworzone z sekwencji występujących na 3'końcu transkryptu genu *cox2* grochu. Strzałkami zaznaczono 3' końce genu zidentyfikowane za pomocą techniki CR RT-PCR oraz przy użyciu nukleazy S1 (wg [34], zmodyfikowano)

WPŁYW POLIDENYLACJI 3` KOŃCA TRANSKRYPTÓW NA ICH STABILNOŚĆ

Obok czynników stabilizujących mitochondrialne transkrypty działają również czynniki degradujące transkrypty. Do tych ostatnich należy poliadenylacja, czyli dołączanie do 3' końca roślinnych mitochondrialnych transkryptów reszt adeninowych niekodowanych w sekwencji genów.

W przypadku większości jądrowych mRNA komórek eukariotycznych poliadenylacja ma pozytywny wpływ na trwałość transkryptów. Zwiększona stabilność poliadenylowanych transkryptów ujawnia się w procesach transportu oraz w translacji mRNA jądrowych [7, 8]. Transkrypty genów drożdży zwierające ogon poliA wiążą białko, tzw. *poliA binding protein*, które z kolei stymuluje wiązanie mRNA z podjednostką rybosomalną 40S. W wiązaniu mRNA z podjednostką 40S uczestniczy czynnik translacyjny eIF-4G, czynnik eIF-4E oraz struktura czapeczki znajdująca się na 5' końcu mRNA. W wyniku tych cząsteczkowych oddziaływań następuje zwiększenie intensywności translacji [52]. Ogon poliA w chloroplastowych transkryptach wykazuje powinowactwo do białka, które jest homologiczne z rybosomalnym białkiem S1 *E. coli*. Dlatego Sarkar [48] sugeruje, że poliadenylacja może odgrywać rolę w inicjacji translacji. Z kolei Rott i inni [47] stwierdzili, że w przypadku transkryptów chloroplastowego genu *rbcL Chlamydomonas reinhardtii,* przedłużenie transkryptu poza dojrzały koniec 3' powodowało, że transkrypty nie łączyły się z polisomami i nie ulegały translacji.

W przypadku mitochondriów roślin zebrano dotychczas kilka przykładów wskazujących na degradujący wpływ dołączania poliA do transkryptów. Gagliardi i Leaver [16] stwierdzili na przykład, że degradacja kotranskryptu *atp1-orf522*, charakterystycznego dla słonecznika z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS),

http://rcin.org.pl

związana jest z poliadenylacją 3' końca. Taka poliadenylacja występuje u roślin z przywróconą płodnością. Okazało się także, że u roślin z przywróconą płodnością przedłużenie kotranskryptu o 19 adenin zmniejsza jego stabilność, co w rezultacie powoduje, że nie akumuluje się on w komórce. Podobne obserwacje poczyniono dla rzepaku z cechą CMS typu Ogura. Bellaoui i inni [4] stwierdzili, że transkrypty *orf138,* które są obecne w roślinach sterylnych, u płodnych rewertantów zawierają ogony poliA i brak im struktury pętli, co zmniejsza ich stabilność i wpływa na szybszą degradację. Potranskrypcyjne dołączanie ogona poliA zaobserwowano również dla transkryptów genu *cox2* kukurydzy, *atp9* grochu, *atp1* wiesiołka, a także w innych mitochondrialnych genach roślin wyższych. We wszystkich przypadkach poliadenylacja ma miejsce w rejonie 3' końca transkryptu, często tuż za strukturą pętli lub nawet w jej obrębie, jak na przykład w transkrypcie genu *atp9* grochu i ziemniaka [17, 35], i wiąże się z przyspieszonym procesem degradacji transkryptu [16, 35].

Jak wynika z prac przeprowadzonych z transkryptami *E. coli,* poliadenylacja nie dotyczy jedynie mRNA lub mniej stabilnych cząsteczek RNA. Zaobserwowano bowiem, że polimeraza RNA dodaje krótkie, 1–7-nukleotydowe ogony poliA do stabilnych cząsteczek, takich jak tRNA czy 5SRNA. Znaczenie funkcyjne tych zmian nie jest jednak dotychczas znane [38, 48]. W komórkach drożdży także stwierdzono obecność około 8- nukleotydowych ogonów poliA na 3' końcach dużych rRNA [56]. W przypadku komórek *Plasmodium falciparum* ogony poliA o różnej długości są natomiast dodawane do niektórych rodzajów pofragmentowanego rRNA. Pełnią one tutaj raczej rolę chroniącą rRNA przed egzonukleolitycznym trawieniem [20, 45]. Ogonów poliA przyłączanych do cząsteczek RNA nie wykryto dotychczas w mitochondrialnych transkryptach roślin.

Ogon poliA mRNA mitochondriów roślinnych jest najczęściej rybohomopolimerem złożonym z reszt adeninowych. Na przykład w transkrypcie *atp1* wiesiołka długość ogona wynosi 16–23 adenin, a w transkrypcie *atp6* grochu od 14 do 25 nukleotydów [35]. W transkrypcie genu *cox2* kukurydzy stwierdzono także występowanie w ogonie innych zasad. Stanowiły one około 20% zasad ogona [41]. Kuhn i in. [35], inkubując w lizacie mitochondrialnym transkrypty genu *atp9* grochu nie mające struktury pętli, a zawierające odpowiednio: 0, 3, 10 i 21 dodatkowych reszt adeninowych wykazali, że tylko ogony przedłużone o 10 i 21 adenin znacząco zwiększały degradację. Analogiczną sytuację zaobserwowano w przypadku transkryptów genu *atp9* grochu mających struktury pętli. Transkrypty zawierające ogony poliA o długości 10 nukleotydów adeninowych pobudzały tworzenie się dojrzałych produktów z prekursorowych RNA, co dowodzi, że ogony poliA o długości 10 i więcej nukleotydów adeninowych mają stymulujący wpływ na proces dojrzewania i degradacji RNA. W innych doświadczeniach stwierdzono, że ogon zawierający tylko 3 lub 5 adenin nie jest wystarczający do zainicjowania procesu degradacji, natomiast 55 nukleotydów adeninowych pobudza degradację na nieco zredukowanym poziomie [17, 35]. W transkryptach chloroplastowych natomiast ogony poliA mogą zawierać nawet kilkaset nukleotydów. W transkrypcie genu *psbA* długość ogona poliA wynosi 250–270 reszt, a skład ogona polinukleotydowego jest następujący: 75% A, 25% G i 5% T lub C [39]. Krótsze

http://rcin.org.pl

ogony polinukleotydowe zaobserwowano w transkryptach drożdży i *E. coli*; miały one długość od 15 do 60 reszt adeninowych [48, 56]. Jaką funkcję spełnia dodawanie krótkich ogonów poliA (do 5 adenin), które wykryto w rRNA ssaków oraz moskitów (36 adenin), na razie nie wiadomo.

Długość ogona poliA wpływa także na szybkość procesu degradacji mitochondrialnych transkryptów roślin *in vitro* [17, 41]. Udowodniono również, że dodanie do ogona poliadenylowego transkryptu genu *atp9* ziemniaka około 7 reszt nieadeninowych hamuje całkowicie proces degradacji tego transkryptu [17]. W chloroplastach stwierdzono także, że tylko ogon poliA działa jak tarcza, zwiększając podatność transkryptów na degradację, podczas gdy ogon poliG (poliguanylowy) takiego wpływu nie wykazuje [39]. W transkryptach mitochondrialnych roślin natomiast ogon poliG o długości 21 adenin wywołuje nawet większy efekt destabilizujący niż ogon poliA [35]. Wykazano również, że ogon poliG nie wpływa degradująco na transkrypty genów reporterowych transformowanych roślin i uważa się, że efekt dodawania ogona poliG do transkryptów może być różny w zależności od przedziału komórkowego [22].

CHARAKTERYSTYKA SEKWENCJI MIEJSC POLIADENYLACJI

W odróżnieniu od mRNA roślin, zwierząt, grzybów i pierwotniaków kodowanych przez jądro, u których poliadenylacja i endonukleolityczne trawienie są ze sobą ściśle związane, a miejsce poliadenylacji zawiera specyficzną sekwencję, mitochondrialne mRNA roślin nie mają zachowawczych motywów sekwencji określających miejsca poliadenylacji [41, 48].

W mRNA *atp9* ziemniaka stwierdzono, że u 94% badanych klonów ogon poliA ulokowany jest w niewielkim rejonie obejmującym 10 zasad znajdujących się 58–68 nukleotydów poniżej 3' końca transkryptu. Pewna część klonów zawierała również ogon poliA 29 nukleotydów poniżej struktury pętli lub w obrębie tej struktury czy bezpośrednio za pętlą. Występowanie miejsc poliadenylacji w obrębie otwartej ramki odczytu danego genu jest zjawiskiem rzadkim. Wiele takich „wewnętrznych" miejsc poliadenylacji znaleziono w genie *cox2* kukurydzy [41]. Natomiast w kilku badanych klonach *atp9* mRNA grochu miejsca poliadenylacji znajdowały się w pozycji od +6 do +2 (gdzie pozycja +1 oznacza pierwszy nieparujący nukleotyd za strukturą podwójnej pętli), względnie w obrębie struktury pętli w pozycji około –20. W większości jednak przypadków miejsce poliadenylacji znajdowało się w pozycji od –2 do –5 [35]. Z kolei w transkrypcie *atp1* wiesiołka poliadenylacja ma miejsce w pozycji +4, +5, +6 [35], natomiast transkrypt *cox3* kukurydzy zawiera miejsce poliadenylacji 56 nukleotydów poniżej kodonu stop [41]. Ciekawe, że w komórkach słonecznika z cechą CMS ogony poliA dodawane są w sześciu miejscach w obrębie 12-nukleotydowego rejonu ulokowanego na 3' końcu kotranskryptu *atpA-orf522*, u podstawy struktury pętli [16]. Miejsc poliadenylacji podobnych do występujących w 3' UTR nie znaleziono w obrębie 5' UTR [17].

http://rcin.org.pl

W komórkach prokariotycznych, w bakteriofagu T7 czy w chloroplastach poliadenylacja produktów endonukleolitycznego cięcia nie wymaga występowania specyficznych elementów sekwencyjnych, choć struktura drugorzędowa RNA może modulować podatność polimerazy poliA [48].

Poznanie sekwencji 3' końca niektórych genów jądrowych: *Saccharomyces cerevisiae*, *Oryza sativa, Arabidopsis thaliana, Drosophila melanogaster, Mus musculus i Homo sapiens* ujawniło znaczne różnice w budowie, co świadczy, że we wszystkich tych organizmach nie występuje uniwersalny element sekwencyjny związany z poliadenylacją. Stwierdzono jednak, że sekwencje miejsc poliadenylacji w transkryptach roślinnych bardziej przypominają odpowiednie sekwencje występujące w komórkach drożdży niż zwierząt [21, 54]. W komórkach wyższych eukariotów dojrzewanie 3' końca mRNA obejmuje dwa etapy: endonukleolityczne przecięcie pre-mRNA i następnie dodanie do nowopowstałych 3' końców ogona poliA przeważnie długości około 250 nukleotydów. Poliadenylacja mRNA u eukariotów zawsze ma miejsce w rejonie 3' nieulegającym translacji, przeważnie 10 do 40 nukleotydów poniżej 6-nukleotydowej sekwencji AAUAAA [2, 35, 36, 54]. W sekwencjach mRNA drożdży i roślin motyw ten jest mniej zachowawczy i obejmuje 6–10-nukleotydowy element sekwencji bogaty w adeninę, który przybiera postać UAUAUA, UAUUUA, UAUGUA, UUUUUAUA [58]. Sekwencje 3' UTR drożdży i roślin zawierające miejsca cięcia i poliadenylacji w odróżnieniu od komórek ssaków obejmują niewielki rejon, przeważnie 100–200 nukleotydów. W sekwencjach genów wszystkich organizmów istotny jest ponadto rejon położony powyżej tych motywów, obejmujący nawet 100 nukleotydów, bogaty w reszty urydylowe, którego delecja znacznie obniża wydajność poliadenylacji. W DNA jądrowym ssaków ważny jest też element leżący poniżej miejsca cięcia i poliadenylacji, bogaty w reszty urydylowe lub też w pary UG. Stwierdzono, że nawet pojedyncze mutacje w sekwencji konsensusowej AAUAAA mogą zapobiegać cięciu RNA i tym samym redukować dodawanie ogona poliA. Okazało się również, że w komórkach ssaków motywy AAUAGA, AAUAGA, AAUGAA są nieaktywne oraz zmiana motywu sygnalnego AAUAAA na motyw AAUAGA w ludzkiej globinie powoduje talasemie [3]. W sekwencjach genów roślinnych 5-nukleotydowa zmiana w obrębie tego bogatego w adeninę rejonu dramatycznie obniża poliadenylację [36].

WPŁYW CZYNNIKÓW STABILIZUJĄCYCH I DEGRADUJACYCH CZĄSTECZKI RNA NA POZIOM TRANSKRYPTÓW

Na poziom występujących transkryptów mRNA wpływają dwa przeciwstawnie działające czynniki. W większości przypadków stabilizujący transkrypt efekt pętli wydaje się być silniejszy. W przypadku transkryptów roślinnych dostarczono kilka dowodów, że stabilność transkryptów mających strukturę pętli jest większa niż

http://rcin.org.pl

transkryptów bez pętli [28]. W przypadku bakterii, poliadenylowane transkrypty pozbawione struktury pętli okazały się bardziej wrażliwe na działanie RNAzy II i fosforylazy polinukleotydowej. Wykazano ponadto, że poliadenylowane transkrypty bez struktury pętli są szybko degradowane, prawie bez pojawiania się struktur pośrednich zawierających RNA bez ogona poliA, oraz że degradacji ulegają również niepoliadenylowane transkrypty niezawierające struktury pętli. Lisitsky i Schuster [40] zaobserwowali, że w chloroplastach poliadenylowane transkrypty inkubowane z egzonukleazą były gwałtownie degradowane, podczas gdy w tych samych warunkach transkrypty niepoliadenylowane pozostawały stabilne w ciągu około 60 minut. Dowodzi to, że ogon poliA dodawany do 3' końca transkryptu promuje wydajniejszą degradację, ale nie jest jej bezpośrednim czynnikiem sprawczym.

Natomiast w mitochondriach kukurydzy okazało się, że nie ma większej różnicy w stabilności transkryptów poliadenylowanych i niepoliadenylowanych [35, 41]. Efekt przyspieszania degradacji transkryptów w wyniku poliadenylacji wydaje się być mniejszy w roślinnych mitochondriach niż w chloroplastach czy komórkach bakterii [28, 41].

Badania grupy S. Bindera [35] ujawniły, że w transkryptach mitochondrialnych roślin usuwanie ogona poliA przez egzonukleazę w większości przypadków przebiega bardzo szybko, natomiast w przypadku występowania innych zasad lub struktury pętli dochodzi do zahamowania działania egzonukleazy. Gagliardi i inni [17] stwierdzili jednak, że w przypadku transkryptu mitochondrialnego genu *atp9* ziemniaka 3'–5' egzonukleaza całkowicie degraduje poliadenylowane transkrypty, nie zatrzymując się na strukturze pętli. Hoffman i inni [28] zasugerowali mechanizm, który może prowadzić do całkowitej degradacji transkryptu, a mianowicie: usunięcie ogona poliA oraz dodatkowo paru innych nukleotydów z sekwencji pętli stymuluje proces ponownej poliadenylacji powstałego produktu i jego egzonukleolityczne trawienie. Proces degradacji przebiega aż do całkowitego usunięcia najpierw stabilizującej pętli, a potem całego transkryptu. O poprawności tego założenia mógłby świadczyć fakt, że w obrębie struktury pętli znaleziono motywy sekwencji związane z poliadenylacją, co może wskazywać, że transkrypty mogłyby być poliadenylowane ponownie oraz że powtarzający się cykl może powodować całkowitą degradację transkryptu pomimo obecności struktury pętli. Miejsca poliadenylacji wewnątrz struktur pętli wiążąc preferencyjnie aktywne RNAzy ułatwiałyby degradację tych struktur [28, 35].

W przypadku mRNA chloroplastów okazało się, że większość miejsc poliadenylacji znajduje się dokładnie w miejscu endonukleolitycznego przecięcia transkryptu. Poliadenylacja aktywuje proces degradacji przez zwiększenie powinowactwa egzonukleazy do „przyciętych" transkryptów [39]. W odróżnieniu jednak od mitochondrialnych transkryptów roślin, których dojrzałe, stabilne mRNA, jak się sądzi, nie są poliadenylowane [17], dojrzałe 3' końce chloroplastowych mRNA mogą być poliadenylowane. Częstość poliadenylacji takich dojrzałych transkryptów jest jednak 50% niższa od poliadenylacji produktów powstałych po cięciu 3' końca transkryptu endonukleazą [49]. Za bardzo ograniczoną poliadenylację dojrzałych 3' końców odpowiedzialne są struktury pętli. Stwierdzono, że chloroplastowe transkrypty

http://rcin.org.pl

niezawierające struktur pętli są poliadenylowane wydajniej i są degradowane gwałtowniej niż te zawierające pętlę [39]. W obecności struktury pętli poliadenylacja 3' końca jest bardzo słaba i tych mRNA jest w chloroplastach najwięcej. Okazało się również, iż, pomimo że w chloroplastach 3' koniec pętli działa jak bariera dla działalności egzonukleazy, może ona być usunięta przez endonukleazę [39].

Ponieważ zauważono, że redagowanie mitochondrialnych transkryptów często zachodzi w pobliżu ich 3' końca, podjęto badania dotyczące wpływu redagowania na cięcie i poliadenylację transkryptów. Ujawniły one, że dołączanie ogonów poliA do mitochondrialnych transkryptów roślin ma miejsce w produktach genów o różnym stopniu redagowania. Przykładem może być cDNA genu *cox2* kukurydzy czy *atp6* sorgo, w których ogony poliA znaleziono w transkryptach zarówno nieredagowanych, jak i redagowanych całkowicie lub częściowo [31, 41]. W mitochondrialnych transkryptach *Trypanosoma brucei* w większości przypadków również nie zaobserwowano zależności między poliadenylacją a procesem redagowania [32, 43]. Uznano więc, że procesy poliadenylacji i redagowania przebiegają niezależnie [18, 28].

Enzymy zaangażowane w degradację mitochondrialnych transkryptów roślin są już częściowo poznane. Jak wspomniano, w procesie transkrypcji w mitochondriach roślin uczestniczą polimerazy RNA typu fagowego. Okazało się, że te same polimerazy są odpowiedzialne za syntezę ogona poliadenylowego dołączanego do 3' końców transkryptów. Podobną sytuację zaobserwowano również u innych organizmów, między innymi u bakterii. Za proces degradacji mRNA są natomiast odpowiedzialne inne enzymy.

W ekstraktach z mitochondriów ziemniaka i słonecznika wykryto dwie różne RNAzy. Są to: RNAza I, która jest endonukleazą degradującą transkrypty w równym stopniu poliadenylowane, jak i niepoliadenylowane, oraz RNAza II, która wykazuje powinowactwo jedynie do poliadenylowanych substratów i ma własności egzonukleazy. Tak jak przewidywano, struktura pętli nie stanowi bariery dla degradujących własności RNAzy II. Wskazuje to, że w mitochondriach ziemniaka i słonecznika to właśnie RNAza II jest aktywowana przez poliadenylację 3' końca transkryptów, a RNAza I prawdopodobnie usuwa produkty pośrednie powstałe podczas trawienia egzonukleazą [16, 17].

Ostatnio z nasion grochu wyizolowano białko będące składnikiem roślinnej wielopodjednostkowej polimerazy poliA. Okazało się, że białko to jest enzymem degradującym RNA, uwalniającym difosforany nukleotydów i wykazującym wysokie podobieństwo do bakteryjnej i chloroplastowej egzonukleazy fosforylazy polinukleotydowej. Prawdopodobnie, roślinna polinukleotydowa fosforylaza jest kofaktorem poli(A)polimerazy wiążącym RNA i odgrywającym ważną rolę w reakcji związanej z poliadenylacją i degradacją transkryptów [37].

Natomiast w skład mitochondrialnego kompleksu degradującego roślin może wchodzić również helikaza RNA SUV3 zależna od ATP, znaleziona ostatnio w mitochondriach rzodkiewnika [15]. Jej funkcją jest prawdopodobnie rozfałdowanie drugorzędowej struktury obecnej na 3' końcu i udostępnienie transkryptu dla działania 3'–5' egzorybonukleazy. Porównując sekwencję aminokwasową AtSUV3 helikazy z rzodkiewnika z sekwencją SUV3 helikazy z innych organizmów, np. drożdży *S.*

http://rcin.org.pl

cerevisiae, nicienia *C. elegans* i *Homo sapiens* stwierdzono, że helikaza z rzodkiewnika jest krótsza w sekwencji o 76–215 aminokwasów. Skrócenie występuje na końcach aminowych i karboksylowych białka, podczas gdy środkowa część białka zawierająca domeny typowe dla DExH RNA helikazy u wszystkich tych organizmów pozostaje niezmieniona. Wśród tych konsensusowych domen są motywy charakterystyczne dla białek o aktywności ATPazy oraz domeny wiążące RNA [15].

U bakterii natomiast wykryto obecność multienzymatycznego kompleksu degradującego transkrypty zwanego degradosomem, w skład którego wchodzą dwie 3'–5' egzorybonukleazy: PNPaza (polinukleotydowa fosforylaza) i RNAza II. Obie są preferencyjnie zaangażowane w wiązanie poliadenylowanych RNA. Ponadto w kompleksie znajduje się też endorybonukleaza – RNAza E oraz co najmniej cztery dodatkowe białka, wśród których zidentyfikowano helikazę RNA i enolazę, które prawdopodobnie rozfałdowują 3' koniec transkryptu tworząc jednoniciowe RNA dostępne dla obu egzonukleaz [23]. W skład kompleksu degradującego transkrypty chloroplastów wchodzi natomiast kodowana przez jądro 3'–5' egzonukleaza 100 RNP (*100-kDa binding protein*), wykazująca wysokie podobieństwo do bakteryjnej PNPazy i również wykazująca wysokie powinowactwo do sekwencji poliA. W degradosomie chloroplastów, podobnie jak u bakterii, znajduje się również endorybonukleaza [25, 57]. W skład drożdżowego kompleksu degradującego transkrypty zwanego czasami egzosomem [1] wchodzić może nawet 5 egzonukleaz, z których co najmniej 3 wykazują aktywność 3'–5' egzonukleaz. Stwierdzono również, że mitochondrialny degradosom drożdży (mtEXO) zawiera SUV3 helikazę zależną od ATP i białko DSS1, które uczestniczy w obróbce RNA i w dojrzewaniu transkryptów mitochondrialnych [9, 11, 12].

PODSUMOWANIE

Pomimo stosunkowo niewielkiej ilości danych wydaje się, że do czynników stabilizujących poziom dojrzałych mitochondrialnych transkryptów roślin należą sekwencje odwrotnie powtórzone tworzące struktury pętli, natomiast dołączane ogony poliA prowadzą do degradacji transkryptów. Zakłada się jednakże, że w przypadku nieobecności sekwencji odwrotnie powtórzonych na 3' końcu transkryptów stabilizująco na transkrypty wpływają inne sekwencje/czynniki, jeszcze nieokreślone.

Poliadenylacja jest procesem zachodzącym powszechnie u eukariotów i również stosunkowo szeroko rozpowszechnionym w mitochondriach roślin. Okazało się, że w przypadku mitochondrialnych transkryptów roślin poliadenylacja jest istotnym etapem obróbki 3' końca transkryptów, a nie tylko ewolucyjną pozostałością. Proces poliadenylacji wpływający degradacyjnie na transkrypty chroni prawdopodobnie mitochondria przed translacją niewłaściwych, niedojrzałych mRNA i akumulacją defektywnych produktów białkowych. Można więc przyjąć, że proces dodawania ogonów poliA do 3' końca transkryptów jest w pewnym stopniu czynnikiem regulującym organellową ekspresję genów.

http://rcin.org.pl

LITERATURA

[1] ANDERSON JSJ, PARKER R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI12 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 1998; **17**: 1497–1506.

[2] AUDIBERT A, SIMONELIG M. Autoregulation at the level of mRNA 3' end formation of the *suppressor of forked* gene of *Drosophila melanogaster* is conserved in *Drosophila virilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 14302–14307.

[3] BEAUDOING E., FREIER S, WYATT JR, CLAVERIE JM, GAUTHERET D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* 2000; **10**: 1001–1010.

[4] BELLAOUI M, PELLETIER G, BUDAR F. The steady-state level of mRNA from Ogura cytoplasmic male sterility locus in *Brassica* cybrids is determined post-transcriptionally by its 3' region. *EMBO J* 1997; **16**: 5057–5068.

[5] BENDICH AJ. Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1996; **255**: 564–588.

[6] BINDER S, HATZACK F, BRENNICKE A. A novel pea mitochondrial *in vitro* transcription system recognizes homologous and heterologous mRNA and tRNA promoters. *J Biol Chem* 1995; **270**: 22182–22189.

[7] COLGAN DF, MANLEY JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *GENES Dev* 1997; **11**: 2755–2766.

[8] CRAMER P, SREBROW A, KADENER S, WERBAJH S, de la MATA M, MELEN G, NOGUES G, KORNBLIHTT AR. Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS Lett* 2001; **498**: 179–182.

[9] DMOCHOWSKA A, GOLIK P, STEPIEN PP. The novel nuclear gene DSS-1 of *Saccharomyces cervisiae* is necessary for mitochondrial biogenesis. *Curr Genet* 1995; **28**: 108–112.

[10] DOMBROWSKI S, BRENNICKE A, BINDER S. 3'-inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators. *EMBO J* 1997; **16**: 5069–5076.

[11] DZIEMBOWSKI A, MALEWICZ M, MINCZUK M, GOLIK P, DMOCHOWSKA A, STEPIEN PP. The yeast nuclear gene DSS1, which codes for a putative Rnase II, is necessary for the function of the mitochondrial degradosome in processing and turnover of RNA. *Mol Gen Genet* 1998; **260**: 108–114.

[12] DZIEMBOWSKI A, STEPIEN PP. Genetic and biochemical approaches for analysis of mitochondrial degradosom from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 2001; **342**: 367–378.

[13] FEY J, MARECHAL-DROUARD L. Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: an illustration of a divergent evolution between Monocot and Dicot mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **256**: 409–414.

[14] FINNEGAN PM, BROWN GG. Transcriptional and post-transcriptional regulation of RNA levels in maize mitochondria. *Plant Cell* 1990; **2**: 71–83.

[15] GAGLIARDI D, KUHN J, SPADINGER U, BRENNICKE A, LEAVER CJ, BINDER S. An RNA helicase (AtSUV3) is present in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *FEBS Lett* 1999; **458**: 337–342.

[16] GAGLIARDI D, LEAVER CJ. Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO J* 1999; **18**: 3757–3766.

[17] GAGLIARDI D, PERRIN R, MARECHAL-DROUARD L, GRIENENBERGER JM, LEAVER CJ. Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by 3'- to 5'-exoribonuclease activity, which proceeds unimpeded by stable secondary structures. *J Biol Chem* 2001; **276**: 43541– 43547.

[18] GIEGE Ph, BRENNICKE A. From gene to protein in higher plant mitochondria. *CR Acad Sci Paris* 2001; **324**: 209–217.

[19] GIEGE Ph, HOFFMANN M, BINDER S, BRENNICKE A. RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria. *EMBO Rep* 2000; **1**: 164–170.

[20] GILLESPIE DE, SALAZAR NA, REHKOPF DH, FEAGIN JE. The fragmented mitochondrial ribosomal RNAs of *Plasmodium falciparum* have short A tails. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2416–2422.

[21] GRABER JH, CANTOR CR, MOHR SC, SMITH TF. *In silico* detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Microbiology* 1999; **96**: 14055–14060.

[22] GUTIERREZ RA, MACINTOSH GC, GREEN PJ. Current prospectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanism of control. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 429–438.

http://rcin.org.pl

[23] HAJNSDORF E, BRAUN F, HAUGEL-NIELSEN J, LE DEROUT J, REGNIER P. Multiple degradation pathways of the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*. Rnase E interacts with the 5' and 3' extremities of the primary transcript. *Biochimie* 1996; **78**: 416–424.
[24] HAYES R, KUDLA J, GRUISSEM W. Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem* 1999; **24**: 199–202.
[25] HAYES R, KUDLA J, SCHUSTER G, GABAY L, MALIGA P, GRUISSEM W. Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complexes is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J* 1996; **15**: 1132–1141.
[26] HEDTKE B, BORNER T, WEIHE A. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 1997; **277**: 809–811.
[27] HESS WR, BORNER T. Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol* 1999; **190:** 1–59.
[28] HOFFMANN M, KUHN J, DASCHNER K, BINDER S. The RNA world of plant mitochondria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; **70:** 119–154.
[29] JAŃSKA H. Organizacja i zmienność genomu mitochondrialnego roślin wyższych. *Wydawnictwo Uniwesrytetu Wrocławskiego* 1997;
[30] JAŃSKA H, WOŁOSZYŃSKA M. The dynamic nature of plant mitochondrial genome organization. *Acta Biochim Pol* 1997; **44**: 239–250.
[31] KEMPKEN F, HOWAD W. Mitochondrial RNA editing is sequence specific and independent of transcript abundance in *Sorgum bicolor*. *Curr Genet* 1996; **30**: 186–189.
[32] KOSLOWSKY DJ, YAHAMPATH G. Mitochondrial mRNA 3' cleavage/polyadenylation and RNA editing in *Trypanosoma brucei* are independent events. *Mol Biochem Parasitol* 1997; **90**: 81–94.
[33] KUBO T, NISHIZAWA S, SUGAWARA A, ITCHODA N, ESTIATI A, MIKAMI T. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA Cys (CGA). *Nucl Acids Res* 2000; **28**: 2571–2576.
[34] KUHN J, BINDER S. RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox2* transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 439–446.
[35] KUHN J, TENGLER U, BINDER S. Transcript lifetime is balanced between stabilizing stem–loop structures and degradation – promoting polyadenylation in plant mitochondria. *Mol Cell Biol* 2000; **21**: 731–742.
[36] LI Q, HUNT AG. The polyadenylation of RNA in plants. *Plant Physiol* 1997; **115**: 321–325.
[37] LI QS, Das GUPTA J, HUNT AG. Polynucleotide phosphorylase is a component of a novel plant poly(A) polymerase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17539–17543.
[38] LI Z, PANDIT S, DEUTSCHER MP. Polyadenylation of stable RNA precursors *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12158–12162.
[39] LISITSKY I, KOTLER A, SCHUSTER G. The mechanism of preferential degradation of polyadenylated RNA in the chloroplast. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17648–17653.
[40] LISITSKY I, SCHUSTER G. Preferential degradation of polyadenylated and polyuridinylated RNA by the bacterial exoribonuclease polynucleotide phosphorylase. *Eur J Biochem* 1999; **261**: 468–474.
[41] LUPOLD SD, CAOILE AGFS, STERN DB. Polyadenylation occurs at multiple sites in maize mitochondrial *cox2* mRNA and is independent of editing status. *Plant Cell* 1999; **11**: 1565–1578.
[42] MACKENZIE S, MCINTOSH L. Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 1999; **11**: 571–585.
[43] MILITELLO KT, READ LK. Coordination of kRNA editing and polyadenylation in *Trypanosoma brucei* mitochondria: complete editing is not required for long poly(A) tract addition. *Nucleic Acids Res* 1999; 1377–1385.
[43a] NOTSU Y, MASOOD S, NISHIKAWA T, KUBO N, AKIDUKI G, NAKAZONO M, HIRAI A, KADOWAKI K. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: fragment DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics* 2002; **264**: 434–445.
[44] ODA K, YAMATO K, OHTA E, NAKAMURA Y, TAKEMURA M, NOZATO N, AKASHI K, KANEGAE T, OGURA Y, KOHCHI T, OHYAMA K. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome. *J Mol Biol* 1992; **223**: 1–7.
[45] REHNKOPF DH, GILLESPIE DE, HARRELL MI, FEAGIN JE. Transcriptional mapping and RNA processing of the *Plasmodium falciparum* mitochondrial mRNAs. *Mol Biochem Parasitol* 2000; **5**;105: 91–103.
[46] REMACLE C, MARECHAL-DROUARD L. Characterization of the potato mitochondrial transcription unit containing "native" *trnS* (GCU), *trnF* (GAA) and *trnP* (UGG). *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 553 – 563.

http://rcin.org.pl

[47] ROTT R, LEVY H, DRAGER RG, STERN DB, SCHUSTER G. 3'-processed mRNA is preferentially translated in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4605– 4611.
[48] SARKAR N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 173–197.
[49] SCHUSTER G, LISITSKY I, KLAFF P. Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol* 1999; **120**: 937–944.
[50] SHIINA T, ALLISON L, MALIGA P. *rbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell* 1998; **10**: 1713–1722.
[51] SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, PACAK A, JANKOWIAK K. New DNA markers for the discrimination between closely related species and for the reconstruction of historical events; example liverworts. Praca przesłana do druku
[52] TARUN SZ Jr, SACHS AB. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 1996; **15**: 7168–7177.
[53] UNSELD M, MARIENFELD JR, BRANDT P, BRENNICKE A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366.925 nucleotides. *Nat Genet* 1997; **15**: 57–61.
[54] WAHLE E, RUEGSEGGER U. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 1999; **23**: 277–295.
[55] WILLIAMS MA, JOHZUKA Y, MULLIGAN RM. Addition of non-genomically encoded nucleotides to the 3'-terminus of maize miotochondrial mRNAs: truncated *rps12* mRNAs frequently terminate with CCA. *Nucl Acid Res* 2000; **28**: 4444–4451.
[56] YUCKENBERG PD, PHILLIPS SL. Oligoadenylate is present in the mitochondrial RNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1982; **2**: 450–456.
[57] YEHUDA-RESHEFF S, HIRSH M, SCHUSTER G. Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 5408–5416.
[58] ZHAO J, HYMAN L, MOORE C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; **63**: 405–445.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 24.09.2002 r.
Przyjęto: 21.10. 2002 r.
60-371 Poznań, ul. Międzychodzka 5
E-mail: doracz@main.amu.edu.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (259–272)

NIESTABILNOŚĆ GENETYCZNA W NOWOTWORACH. I. NIESTABILNOŚĆ CHROMOSOMOWA W NOWOTWORACH

GENETIC INSTABILITY IN CANCER. I. CHROMOSOMAL INSTABILITY IN CANCER

Maria SĄSIADEK[1*], Kamila SCHLADE-BARTUSIAK[1], Agnieszka STEMBALSKA-KOZŁOWSKA[1], Aleksandra BIELAWSKA-POHL[2], Robert ŚMIGIEL[3], Danuta DUŚ[2]

[1] Zakład Genetyki Akademii Medycznej we Wrocławiu,
[2] Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu,
[3] Katedra Patofizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie: Niestabilność genetyczna, chromosomowa lub/i mikrosatelitarna jest jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych. W komórkach nowotworowych zarówno guzów litych, jak i nowotworów układu krwiotwórczego niestabilność chromosomowa wyraża się nagromadzeniem aberracji strukturalnych i liczbowych chromosomów. Aberracje chromosomów w nowotworach mogą być zmianami swoistymi, o kluczowym znaczeniu dla procesu transformacji lub też wtórnymi, będącymi wyrazem i jednocześnie przyczyną niestabilności genetycznej komórek nowotworowych. W pracy przedstawiono poglądy na mechanizm powstawania, metody diagnozowania oraz znaczenie aberracji liczbowych i strukturalnych w niestabilności genetycznej w nowotworach.

Słowa kluczowe: niestabilność genetyczna, aberracje chromosomowe, aneuplodia, nowotwory.

Summary: Chromosomal and/or microsatellite genetic instability is one of characteristic features of malignant cells. In solid tumours, as well as in haematological tumours, chromosomal instability is expressed by accumulation of structural and numerical aberrations. Chromosomal aberrations can play a key role in cancer initiation and progression, or can be a feature of genetic instability that cells acquire during tumour development. In this review a role of chromosomal instability in overall genetic instability of cancer cells is presented.

Key words: genetic instability, chromosomal aberrations, aneuploidy, cancer.

http://rcin.org.pl

1. WSTĘP

Niestabilność genetyczna, chromosomowa lub/i mikrosatelitarna jest jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych. U pacjentów z niektórymi nowotworami jest również stwierdzana tzw. "ukryta niestabilność chromosomowa" w komórkach prawidłowych.

W komórkach nowotworowych zarówno guzów litych, jak i nowotworów układu krwiotwórczego niestabilność chromosomowa wyraża się nagromadzeniem aberracji strukturalnych i liczbowych chromosomów. Od momentu identyfikacji chromosomu Philadelphia w przewlekłej białaczce szpikowej wyłoniono kilka tysięcy aberracji chromosomowych w nowotworach, z czego ponad 200 wydaje się pełnić istotną rolę w transformacji i/lub progresji nowotworów [53]. Wykrycie aberracji chromosomowych i określenie ich korelacji z parametrami klinicznymi i histopatologicznymi ma istotne znaczenie zarówno w rozpoznawaniu, klasyfikacji, określeniu ryzyka progresji i rokowaniu w nowotworach, jak i w monitorowaniu przebiegu ich leczenia [52,54].

Aberracje chromosomowe można podzielić na zmiany pierwotne (specyficzne dla danego typu nowotworu, zwykle aberracje zrównoważone) leżące u podstaw transformacji nowotworowej, których obecność w komórkach ma wartość zarówno diagnostyczną, jak i prognostyczną [1,53,66], oraz zmiany wtórne (niespecyficzne, zwykle niezrównoważone) pojawiające się w trakcie progresji choroby, a będące wyrazem niestabilności genetycznej komórki [10,58]. Mimo licznych badań dla wielu nowotworów nie udało się określić swoistych zmian chromosomowych. W guzach litych, stanowiących ok. 95% wszystkich nowotworów, liczba poznanych, swoistych zmian cytogenetycznych jest niewielka. Wynika to często z problemów technicznych przy przygotowaniu dobrej jakości preparatów chromosomowych, głównie jednak ze złożoności obserwowanych zmian cytogenetycznych. Diagnostyka ta jest zwykle prowadzona w zaawansowanych stadiach nowotworu, po nabyciu przez komórki w etapach promocji i progresji wtórnych zmian genetycznych. W związku z tym identyfikacja zmian pierwotnych ukrytych w złożonych kariotypach jest niekiedy bardzo trudna.

Łatwiejszymi do badań są nowotwory układu krwiotwórczego i chłoniaki. Większość poznanych klonalnych aberracji chromosomowych i swoistych mutacji zaobserwowano w tej właśnie grupie nowotworów.

Molekularne podłoże niestabilności chromosomowej nie jest jeszcze do końca poznane, ale nie ulega wątpliwości, że mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie aberracji strukturalnych są odmienne niż mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie aberracji liczbowych chromosomów.

2. ABERRACJE STRUKTURALNE CHROMOSOMÓW

Analiza aberracji chromosomowych w nowotworach pozwoliła na identyfikację ponad 200 powtarzających się, specyficznych strukturalnych aberracji chromo-

http://rcin.org.pl

TABELA 1. Przykłady niektórych swoistych aberracji hromosomowych występujących w komórkach nowotworowych układu krwiotwórczego, chłoniaków i guzów litych (na podstawie piśmiennictwa [8,48,49,7])

Nowotwór	Rodzaj aberracji chromosomowej
Nowotwory układu krwiotwórczego:	
Zespoły mielodysplastyczne	del(5q),-7,+8,del(20q),-Y
Przewlekła białaczka szpikowa	t(9;22)(q34;q11)
Chłoniak złośliwy	t(14;18)(q32;q21)
Chłoniak Burkitta	t(8;14)(q24;q32)
Ostra białaczka limfoblastyczna	t(1;19)(q23;p13) t(4;11)(q21;q23)
Ostra białaczka szpikowa	inv(16)(p13;q22)/t(16;16) ; t(8;21)(q22;q22)
Guzy lite:	
Tłuszczakomięśniak śluzowaty	t(12;16)(q13;p11) ; t(12;22)(q13;q12)
Maziówczak złośliwy	t(X;18)(p11.2;q11.2)
Mięsak jasnokomórkowy	t(12;22)(q13;q12)
Włókniakomięsak dziecięcy	t(12;15)(p13;q25)
Mięsak Ewinga	t(11;22)(q24;q12) ; t(21;22)(q22;q12) ; t(7;22)(p22;q12) ; t(2;22)(q33;q12)

somowych, głównie translokacji (t), delecji (del) i inwersji (inv) (tab. 1) [8,48,49,73]. Najczęściej stwierdzanymi w nowotworach swoistymi aberracjami chromosomowymi są translokacje zrównoważone. Niektóre z nich prowadzą do nadekspresji na skutek przeniesienia protoonkogenu w obszary genomu, w których znajdują się sekwencje wzmacniające jego transkrypcję (ang. *enhancer*). Przykładem może być aktywacja protoonkogenu *c-MYC* w chłoniaku Burkitta wskutek przeniesienia protoonkogenu w sąsiedztwo genów kodujących ciężki łańcuch immunoglobuliny, *IGH* [t(8;14)(q24;q32)]. Inne translokacje mogą prowadzić do fuzji fragmentów dwóch genów leżących w miejscach złamań i utworzenia genu, kodującego białko o nowych właściwościach biologicznych, jak ma to często miejsce w rozrostach szpikowych i w guzach litych [53,67]. Przykładem genu fuzyjnego jest ABL-BCR, który powstaje w wyniku translokacji t(9;22)(q34;q11) w ostrej białaczce limfoblastycznej i szpikowej [3].

2.1. Mechanizm powstawania aberracji strukturalnych chromosomów

Powstawanie aberracji chromosomowych jest skomplikowanym i nie do końca wyjaśnionym procesem komórkowym [76]. Ostatnio opublikowane prace wskazują, że najważniejszym typem zmian w DNA prowadzącym do powstania CA są złamania podwójnej nici DNA (ang. *double-strand breaks*, DSB) [30,55,60,85]. Powstaje pytanie, jaki jest mechanizm przekształcania tak małego uszkodzenia w DNA (DSB to utrata 1–3 pz) w zmianę obserwowaną mikroskopowo, rzędu 15–45 Mpz. Istnieje kilka teorii opisujących sposób przekształcania pierwotnych uszkodzeń w DNA w aberracje chromosomowe. Przez wiele lat dominującą teorią powstawania CA była tzw. *breakage-and-reunion theory*. Według tej teorii złamania podwójnej nici DNA mogą prowadzić do strukturalnych aberracji typu wymian (translokacje, figury radialne). Takie zmiany

http://rcin.org.pl

pojawiają się, jeśli dojdzie do interakcji między dwoma bądź więcej DSB, które powstały w tym samym czasie w fizycznie niedużej odległości od siebie. CA typu złamań bądź terminalnych delecji powstają na skutek braku naprawy i fizycznego powiększania się pierwotnej zmiany w nici DNA podczas kondensacji chromatyny w czasie formowania się chromosomu metafazalnego [77]. W latach osiemdziesiątych została wprowadzona przez Chadwicka i Leenhoutsa [12] teoria molekularna (*molecular theory*) powstawania CA, według której tylko jedna zmiana typu DSB jest konieczna do powstania CA i działa ona jak włącznik interakcji (wymiany) między DSB a nieuszkodzoną chromatyną. Ostatnio został opublikowany przez Bryanta i wsp. [11] model konwersji DSB w CA zakładający aktywny udział w tym procesie enzymatycznego systemu reparacji uszkodzeń komórki (tzw. *signal model*). Zgodnie z tym modelem, powstanie DSB „zmusza" komórkę do przeprowadzenia rekombinacyjnej wymiany materiału genetycznego w obrębie chromatydy lub między chromatydami siostrzanymi w miejscu uszkodzenia, a CA są wynikiem niekompletnego procesu wymiany siostrzanych chromatyd.

3. ABERRACJE LICZBOWE CHROMOSOMÓW

Aberracje liczbowe, w nowotworach polegające najczęściej na zwiększeniu liczby chromosomów, prowadzą do powstania poliploidii lub aneuploidii. W poliploidii liczba chromosomów jest prostą wielokrotnością n i jest większa od 2n. Garnitur zawierający 3n określamy jako triploidalny, 4n jako tetraploidalny itd. [68]. Aneuploidia ma miejsce, gdy liczba chromosomów nie jest prostą wielokrotnością n. Aneuploidię polegającą na braku jednego z chromosomów nazywamy monosomią. Obecność jednego dodatkowego chromosomu określa się jako trisomię. Jeżeli w garniturze diploidalnym występują dwa dodatkowe homologiczne chromosomy, stan taki nazywamy tetrasomią. Obecność dwóch dodatkowych, niehomologicznych chromosomów nazywamy podwójną trisomią.

Aberracje liczbowe chromosomów w nowotworach mogą być, podobnie jak aberracje strukturalne, zmianami swoistymi, o kluczowym znaczeniu dla procesu transformacji lub też wtórnymi, będącymi wyrazem i jednocześnie przyczyną niestabilności genetycznej komórek nowotworowych [52]. Przykładem swoistych aberracji liczbowych, mających znaczenie diagnostyczne i prognostyczne może być obserwowana w dziedzicznych rakach brodawek nerkowych (*hereditary papillary renal carcinoma* – HPRC) trisomia chromosomu 7, połączona z określonym podtypem histologicznym [23,88], czy też trisomia 8 obserwowana w 70% przypadków w przebiegu kryzy blastycznej w przewlekłej białaczce szpikowej [57]. Niekiedy, tak jak w przypadku trisomii 14 w zespołach mieloproliferacyjnych obecność trisomii nie determinuje przebiegu klinicznego choroby [33]. W płaskonabłonkowych rakach głowy i szyi, mimo braku specyficznych aberracji liczbowych chromosomów wykazano, że aneuploidia stwierdzona badaniami FISH (fluorescencyjna *in situ* hybrydyzacja) w komórkach interfazalnych jest ważnym markerem do wykrywania subklinicznych zmian nowotworowych, a także ognisk „resztkowych" nowotworu [22].

http://rcin.org.pl

Patolog często napotyka trudności w różnicowym rozpoznaniu proliferujących zmian łagodnych i złośliwych. Pojawienie się aneuploidii jest jednym z najlepszych markerów komórek nowotworowych, zwłaszcza w guzach litych. Metodami cytometrycznymi stwierdzono obecność aneuploidii w ok. 70% z ponad 7000 analizowanych nowotworów zarówno narządowych, jak i układowych [68].

Stwierdzenie, że pojawienie się aneuploidii wiąże się z niekorzystną prognozą, pierwsi sformułowali Atkin i Kasperson w 1979 roku (cyt. za [68]). Pomiar zawartości DNA w guzach nowotworowych wykonywano wówczas metodą Feulgena. Po wprowadzeniu techniki cytometrii przepływowej oraz metody oznaczania DNA ze skrawków parafinowych [27] możliwe było przeprowadzanie badań zarówno prospektywnych, jak i retrospektywnych, a więc weryfikacja wartości prognostycznej stwierdzanej aneuploidii. U pacjentów z zaawansowanymi postaciami nowotworu stwierdzenie obecności aneuploidii nie ma zwykle większego wpływu na prognozę przebiegu choroby. Natomiast pojawienie się aneuploidii DNA we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu jest istotnie znaczące dla diagnostyki różnicującej między rozrostem łagodnym i złośliwym oraz wskazuje na prawdopodobieństwo progresji nowotworu. Dotyczy to wielu rodzajów nowotworów, m.in. raków: okrężnicy [59], piersi [28,29], pęcherza moczowego [41], prostaty [89], jajnika [83], endometrium [36], szyjki macicy [40], raka płaskonabłonkowego krtani [86] jak również czerniaka [42]. Obecnie w wielu ośrodkach oznaczanie ploidii DNA w nowotworach we wczesnym stadium zaawansowania w istotny sposób wspiera pozostałe możliwości diagnostycznie i prognostyczne. Na przykład pojawienie się aneuploidii w zmianach wieloogniskowych w pęcherzu moczowym [65] lub w gruczolaku jelita grubego [43] świadczą o tendencji do nawrotów i złośliwienia zmiany. W przedinwazyjnym raku piersi obecność aneuploidii korelowała dodatnio z wcześniejszym wystąpieniem wznowy [28]. Z kolei w ope-racyjnym raku jelita grubego, sklasyfikowanym jako Duke'a B2 obecność aneuploidii znamiennie zwiększa ryzyko wznowy i skrócenia czasu przeżycia [59]. W czerniaku aneuploidia wskazuje na wyższe ryzyko wznowy i tworzenia odległych przerzutów [42]; w raku żołądka i w raku szyjki macicy jest skorelowana z ich wysoką inwazyjnością [40,82]. Tak więc w większości raków obecność aneuploidii związana jest z nieko-rzystnym rokowaniem, mierzonym skróconym czasem przeżycia w porównaniu z analogicznymi guzami diploidalnymi.

Aberracje liczbowe są często obserwowane w nowotworach i mimo intensywnych badań wciąż trwa dyskusja, czy są one zjawiskiem pierwotnym czy wtórnym w procesie transformacji nowotworowej. Duesberg i Rasnick [20], na podstawie badań doświadczalnych nad indukcją nowotworów mutagenami chemicznymi sformułowali tezę, że aneuploidia jest zjawiskiem niezbędnym zarówno w inicjacji, jak i progresji procesu transformacji nowotworowej.

3.1. Mechanizm powstawania aneuploidii

Przyjmuje się, że komórki stają się aneuploidalne w czasie nieprawidłowego podziału komórkowego mejotycznego lub mitotycznego, zwykle w wyniku braku rozdziału (ang. *non-dysjunction*) w anafazie, gdy obie chromatydy jednego lub kilku chromosomów

http://rcin.org.pl

nie rozdzielają się i przechodzą łącznie do jednego z biegunów. W rezultacie jedna z komórek potomnych uzyskuje jeden lub kilka dodatkowych chromosomów, natomiast druga traci je i zwykle ginie. Istnieje również teoria zakładająca, że jest aneuploidia skutkiem bloku podziału komórki w fazie M. W wyniku tego powstaje komórka tetraploidalna, która wchodzi w cykl komórkowy i tracąc w trakcie następnych podziałów, chromosomy w sposób losowy, staje się komórką hypotetraploidalną [4,24].

Punkty kontrolne cyklu komórkowego zostały zdefiniowane empirycznie w 1989 roku przez Hatrwella i Weinerta [62]. Konserwatywny mechanizm regulujący przechodzenie komórki przez poszczególne fazy cyklu komórkowego opiera się głównie na dwóch rodzajach białek – cyklinach i kinazach cyklinozależnych. W miarę przechodzenia komórki przez fazy G_1, G_2 i S kolejno wzrasta poziom cyklin typu D, A, E i w końcu B. Cykliny te łączą się z odpowiednimi kinazami cyklinozależnymi (Cdk). Oscylacyjne zmiany stężenia Cdk powodują fosforylację kolejnych składowych mechanizmu kontrolującego podziały komórkowe, inicjując tym samym następne etapy cyklu [21].

W proliferującej komórce funkcjonuje kilka punktów kontrolnych: Punkt restrykcyjny G_1/S, na granicy przejścia z fazy G_1 do fazy S, który decyduje, czy komórka rozpocznie kolejny cykl podziałowy albo też wstrzyma proliferację. Szczególną rolę na tym etapie kontroli odgrywają: białko supresorowe p53 i cyklina D. Ten punkt kontrolny jest odpowiedzialny za prawidłowy przebieg procesu podwajania materiału genetycznego. W wypadku wykrycia uszkodzeń DNA, jego synteza ulega znacznemu spowolnieniu. Równocześnie zostają uruchomione mechanizmy zmierzające do naprawy uszkodzonego materiału genetycznego. Odpowiedź ta generowana jest w głównej mierze przez kinazy ATM/ATR. Punkt kontrolny fazy G2 uniemożliwia rozpoczęcie mitozy, jeśli nie został zakończony proces replikacji DNA i/lub wykryte zostały jego uszkodzenia. Na tym etapie również działają kinazy ATM/ATR oraz inhibitory kinaz cyklinozależnych. Mitoza nadzorowana jest przez punkt kontrolny wrzeciona mitotycznego, który pozwala na precyzyjną segregację chromosomów w anafazie, pod warunkiem prawidłowo uformowanego wrzeciona. Wtedy do kinetochorów chromosomów ustawionych w płytce metafazalnej przyłączają się oscylujące włókna wrzeciona mitototycznego. Jest to sygnał dla białka MAD2, aby oddysocjować z kompleksu APC/CDC20 (*anaphase-promoting complex/białko CDC20*). Po uwolnieniu białka MAD2 kompleks APC/CDC20 zostaje zaktywowany i unieczynniając sekuryny, włącza heparyny – białka zdolne do rozdzielenia chromatyd siostrzanych. W przypadku zaistnienia defektu któregoś z białek biorących udział w tym procesie następuje blok komórki w anafazie, do czasu prawidłowego przyłączenia chromosomów do wrzeciona podziałowego. Defekt w punkcie kontrolnym wrzeciona mitotycznego może prowadzić do pojawiania się zespołu niestabilności chromosomów, a to z kolei – do aneuploidii. Na przykład w komórkach z mutacją uniemożliwiającą hamowanie kompleksu APC/CDC20, separyny rozdzielają chromatydy, które nie zostały przyczepione do włókien wrzeciona podziałowego. Konsekwencją tego są komórki potomne z delecją chromosomów. Delecja jednego allelu MAD2, białka koniecznego do zatrzymania podziału komórki do momentu połączenia wszystkich chromosomów do wrzeciona podziałowego, powoduje przedwczesną separację chromatyd siostrzanych. Myszy z delecją w genie Mad (Mad2$^+$)

http://rcin.org.pl

z wysoką częstością zapadają na białaczki [18,51]. Również komórki pozbawione genu kodującego sekurynę (Securin$^{-/-}$) po podziale tworzą komórki aneuploidalne, ze względu na niekompletny rozdział chromatyd jednego lub kilku chromosomów [35]. Mechanizmy zatrzymania cyklu komórkowego w punktach kontrolnych mogą zawieść z kilku powodów. Po pierwsze, jak wszystkie procesy komórkowe, mają one pewien margines błędu. Po drugie, komórka adaptuje się do powtarzającego się błędu. Po kilkakrotnym zatrzymaniu cyklu komórkowego z powodu kolejnych nienaprawionych uszkodzeń DNA, cykl może zostać wznowiony. Po trzecie, sam punkt kontrolny może ulec uszkodzeniu [62]. Błędne działanie przynajmniej jednego z punktów kontrolnych można stwierdzić w większości nowotworów.

Poszukiwanie aneuploidii DNA w nowotworach może służyć trzem celom: wykryciu obecności nowotworu, różnicowej diagnostyce oraz prognozowaniu przebiegu (progresji) choroby nowotworowej.

4. UKRYTA, KONSTYTUTYWNA NIESTABILNOŚĆ CHROMOSOMÓW

Jak wspomniano powyżej, u pacjentów z niektórymi chorobami nowotworowymi, a także u ich zdrowych krewnych zaobserwowano występowanie w komórkach prawidłowych (najczęściej limfocytach krwi obwodowej) tzw. „ukrytą niestabilność chromosomów". Ukryta niestabilność chromosomów wyraża się zwiększoną ich podatnością na działanie związków klastogennych (indukujących aberracje strukturalne chromosomów) i jest wykorzystywana jako marker do oceny sprawności mechanizmów reparacyjnych biorących udział w usuwaniu zaburzeń struktury chromosomów. Ukrytą niestabilność chromosomów można wykryć po zadziałaniu na komórki *in vitro* (najczęściej stosowane są limfocyty) związkami klastogennymi o bezpośrednim działaniu, które nie wymagają aktywacji metabolicznej [15, 31, 74].

Do badań nad ukrytą niestabilnością chromosomów najczęściej stosowany jest test bleomycynowy, wprowadzony w 1983 roku przez Hsu i wsp. [31,32], którzy wykazali, że konstytucyjna niestabilność chromosomowa może być ujawniona przez indukcję bleomycyną (BL) złamań chromosomów w fazie S-G_2 cyklu komórkowego. Ukrytą niestabilność chromosomową w tym teście ocenia się na podstawie średniej liczby złamań chromatyd w przeliczeniu na jedną komórkę (tzw. wskaźnik b/c; ang. *breaks per cell*) oraz procentu metafaz z jednym bądź większą liczbą złamań chromosomów (am%; ang. *percentage of aberrant metaphases*). Hsu i wsp. wprowadzili pojedyncze kryterium wrażliwości na mutagen – b/c>1. Wartość wskaźnika b/c (liczba pęknięć chromosomów) < 0,8 oznacza stabilność chromosomową, b/c = 0,8–1,0 niestabilność chromosomową, natomiast wartość wskaźnika b/c = 1,0 i b/c>1,0 oznacza podwyższoną niestabilność chromosomową. Bardziej restrykcyjne, podwójne kryterium, uwzględniające oba oceniane parametry (b/c>1 i am%>45) zostało wprowadzone przez Tzanchevą i Komitowskiego [84]. W badaniach przeprowadzonych na różnych grupach pacjentów wykazano, że wrażliwość na bleomycynę jest cechą konstytutywną komórek

http://rcin.org.pl

i nie podlega wpływom czynników egzogennych [14,61]. Testu bleomycynowego nie można jednak stosować w celu prognozowania zwiększonej indywidualnej, osobniczej podatności na wystąpienie choroby nowotworowej, a jedynie w celu charakterystyki genetycznej grup pacjentów, gdyż zwiększona niestabilność chromosomów jest obserwowana u około 16% populacji ludzi zdrowych.

Zwiększoną ukrytą niestabilność chromosomów wykazano u pacjentów z nowotworami głowy i szyi, układu oddechowego, pokarmowego, piersi, skóry, a także glejakami i in. [2,16,69,87]. W badaniach nad zjawiskiem „ukrytej niestabilności chromosomowej" pacjentów w grupach pacjentów z rakiem krtani oraz rakiem piersi i członków ich rodzin stwierdzono ponadto zwiększoną wrażliwość na bleomycynę nie tylko u chorych, lecz także u zdrowych członków ich rodzin [46,75]. Badania przeprowadzone przez Cloos i wsp. na grupie 218 pacjentów z rakami płaskonabłonkowymi głowy i szyi wykazały, że nadwrażliwość na bleomycynę jest potencjalnym markerem występowania tzw. „późnych", kolejnych pierwotnych guzów głowy i szyi, gdy odstęp czasowy między ich pojawianiem się wynosi powyżej 3 lat [13].

Innym testem stosowanym w badaniach niestabilności chromosomowej jest diepoksybutan (DEB). Związek ten indukuje efektywnie dwa niezależne zjawiska: aberracje chromosomowe i wymiany siostrzanych chromatyd. Analizę aberracji chromosomowych indukowanych *in vitro* przez DEB w limfocytach krwi obwodowej wykorzystuje się w diagnostyce anemii Fanconiego (FA) [80]. Standardową, 72-godzinową. hodowlę limfocytów poddaje się w 24 godz. działaniu 0,1 mg/ml DEB. Diagnostyka polega na obserwacji w preparatach barwionych barwnikiem Giemsy takich parametrów, jak: procent uszkodzonych komórek (%am), liczba złamań na komórkę (b/c) i procent figur radialnych. U chorych z FA obserwuje się %am > 80%, b/c> 5,6, a figury radialne stanowią 30–100% obserwowanych aberracji [72,80].

Jedną z przyczyn występowania indywidualnie zróżnicowanej wrażliwości na działanie czynników klastogennych jest różna zdolność reparacji indukowanych uszkodzeń DNA przez systemy naprawcze DNA komórek. Do oceny zdolności reparacji uszkodzeń DNA może być wykorzystywana analiza odpowiedzi adaptacyjnej [81]. Stwierdzono, że ekspozycja na działanie niskich dawek czynnika genotoksycznego pobudza mechanizmy naprawcze badanych limfocytów, co powoduje zmniejszenie liczby aberracji po zastosowaniu wyższej dawki tego samego lub podobnie działającego związku. Uważa się, że zjawisko odpowiedzi adaptacyjnej jest wyrazem indukcji mechanizmów naprawczych DNA. Odpowiedź adaptacyjną można oceniać na podstawie analizy aberracji chromosomowych lub częstości wymian siostrzanych chromatyd z wykorzystaniem różnych metod cytogenetyki klasycznej lub molekularnej (FISH) [78].

5. METODY DIAGNOSTYCZNE

Aberracje chromosomowe można badać metodami klasycznej cytogenetyki, analizując chromosomy wybarwione technikami prążkowymi. Najczęściej stosowane jest barwienie GTG (ang. *G-bands by trypsin using Giemsa*), które prowadzi do

http://rcin.org.pl

uwidocznienia na chromosomach obrazu prążkowego odzwierciedlającego ich strukturalne i funkcjonalne zróżnicowanie. Obszary ciemno wybarwione odpowiadają regionom zawierającym nieliczne aktywne geny, natomiast jaśniejsze zabarwienie charakterystyczne jest dla regionów aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny [26]. Identyfikację chromosomów wykonuje się zgodnie z kryteriami międzynarodowego systemu nomenklatury cytogenetycznej (ISCN 1995, [34]). Analiza chromosomów barwionych technikami prążkowymi pozwala na zlokalizowanie punktów złamań chromosomów, wykrycie translokacji wzajemnych i inwersji. W celu wykrycia chromosomów di- czy też policentrycznych stosuje się barwienie CBG (*C-bands by barium hydroxide using Giemsa*). Zastosowanie tych technik często jest jednak ograniczone trudnościami w uzyskaniu odpowiedniej liczby metafaz wysokiej jakości, umożliwiającej dokładną ocenę chromosomów. Pomocne są techniki cytogenetyki molekularnej umożliwiające detekcję i ocenę aberracji chromosomowych nawet bez konieczności izolacji chromosomów. Do najczęściej stosowanych metod należy fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) w jądrach interfazalnych, którą można zastosować do badań komórek pochodzących ze świeżej tkanki, po hodowli, a także z preparatów utrwalonych w parafinie oraz genomowa komparatywna hybrydyzacja (ang. *comparative genomic hybridisation*; CGH), w której wykorzystywany jest DNA wyizolowany z komórek nowotworowych [7,10,37,44,50,71].

Technika FISH polega na wykrywaniu określonych sekwencji w chromosomach i/lub jądrach interfazalnych utrwalonych w preparacie cytogenetycznym z wykorzystaniem reakcji hybrydyzacji (tworzenia dwuniciowych kompleksów, przez jednoniciowe fragmenty DNA) sond molekularnych z komplementarnym do nich DNA chromosomowym. Sondy molekularne są znakowane fluorescencyjnie, co umożliwia detekcję w badanym preparacie [56]. Metoda FISH pozwala na wykrycie aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów, takich jak: delecje, translokacje czy chromosomy markerowe [63,64]. W diagnostyce molekularnej kariotypu komórek nowotworowych coraz częściej stosuje się modyfikacje metody FISH-SKY (ang. *spectral karyotyping*) oraz mFISH (ang. *multicolor FISH*), za pomocą których można wszystkie chromosomy wybarwić na różne kolory, co pozwala na pełną analizę kariotypu [6,7,25,38,50,79]. Metody te stosuje się głównie do wykrywania translokacji. Inny typ aberracji zrównoważonych – inwersje, można zaobserwować po zastosowaniu COD-FISH (ang. *Chromosome Orientation and Direction-FISH*). Reakcja ta pozwala na określenie kierunku sekwencji badanego DNA, a co za tym idzie, obserwację odwrócenia sekwencji o 180° w przypadku inwersji [5]. Technika CGH polega na hybrydyzacji znakowanego fluorescencyjnie genomowego DNA nowotworowego oraz DNA prawidłowego do prawidłowych chromosomów metafazalnych. Porównanie emisji fluorescencji z tych dwóch rodzajów DNA wyznakowanych różnymi fluorochromami po reakcji hybrydyzacji pozwala na wykrycie naddatków lub ubytków materiału genetycznego w badanym DNA nowotworowym [9,17,39].

Do badania ploidii metodami cytometrycznymi wprowadzono parametr opisujący analizowane DNA – tzw. indeks DNA (DI), wyliczany jako stosunek modalnej zawartości DNA w populacji badanej do zawartość DNA w komórkach prawidłowych

http://rcin.org.pl

danego gatunku. Indeks DNA koreluje z liczbą chromosomów oznaczanych za pomocą analizy kariotypu. Próbki o zawartości DNA identycznej z komórkami prawidłowymi (diploidalne) mają DI = 1. Populacje, których DI jest różny od stwierdzanego w komórkach prawidłowych, określane są mianem aneuploidalnych, przy czym gdy DI < 1 określane są mianem hypodiploidalnych, gdy DI > 1 > 2 – hypotetraploidalnych, zaś gdy DI = 2 – tetraploidalnych. Jak wykazano, DI proliferującej populacji aneuploidalnych komórek nowotworowych wzrasta z każdym kolejnym podziałem komórki osiągając stan równowagi między 1,5 a 2 (cyt. za [70]).

Do rutynowego poszukiwania aneuploidii metodą z wyboru jest cytometria przepływowa. Pozwala ona na jakościową i ilościową ocenę populacji komórek badanych. Wadą tej metody jest jej ograniczona czułość, związana z rozdzielczością aparatu – mianowicie, DI = 0,05 odpowiada 1 chromosomowi, podczas gdy w tej metodzie różnicująca zawartość DNA wynosi co najmniej 0,10 DI. W przypadku zmian mniejszych ilościowo (monosomia, trisomia itp.), korzystniej jest posłużyć się cytometrią obrazową lub badaniami cytogenetycznymi, opisanymi powyżej.

6. PODSUMOWANIE

Niestabilność genetyczna odgrywa kluczową rolę w procesie transformacji nowotworowej. Ostatnio postawiono hipotezę, że niestabilność genetyczna komórek nowotworowych jest wykładnikiem stopnia ich aneuploidii [19,45]. W niewielkim odsetku przypadków niestabilność, wyrażona na poziomie nukleotydów, jest wynikiem substytucji pojedynczych zasad, delecji lub insercji kilku nukleotydów. Jednak w większości nowotworów zmiany są ilościowo większe, możliwe do rejestracji na poziomie chromosomów: utrata lub dodanie całych chromosomów lub ich dużych fragmentów. Z hipotezy tej może wynikać wniosek, że to właśnie aneuploidia leży u podstaw patogenezy nowotworów. Wiele z obserwowanych cech fenotypowych komórek nowotworowych, opisywanych dotychczas jako „mutacje somatyczne" może być jej wynikiem [19,70]. Wśród nich wymienia się zmienioną wielkość i morfologię komórek, zmiany w proporcjach produkowanych białek: enzymów, antygenów i cząsteczek adhezyjnych i związane z tym utratę zahamowania kontaktowego i zwiększoną adhezyjność, oporność na cytostatyki oraz tzw. „nieśmiertelność", czyli zdolność do nieograniczonej proliferacji [47,70]. Wydaje się, że w związku z bliższym poznaniem mechanizmu powstawania aneuploidii prawdopodobnie wkrótce można oczekiwać rewizji obecnie przyjętej teorii karcinogenezy. Biorąc jednak pod uwagę udowodnioną etiologię genetyczną niektórych nowotworów np. występujących rodzinnie, w których proces transformacji nowotworowej zapoczątkowany jest utratą funkcji genów supresorowych, autorzy niniejszego opracowania są raczej zwolennikami tezy, że zarówno „etiologia genetyczna", jak i sekwencja zdarzeń genetycznych w różnych nowotworach jest różna i zgodna z teorią o heterogennej etiologii nowotworów.

„Ukryta niestabilność chromosomów" jest cechą konstytutywną, modyfikującą indywidualną wrażliwość na działanie czynników rakotwórczych.

http://rcin.org.pl

PIŚMIENNICTWO

[1] AMAN P. Fusion genes in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 1999; **9**: 303–318.
[2] ANKATHIL R, JYOTHISH B, MADHAVAN J, NAIR MK. Deficient DNA repair capacity: a predisposing factor and high risk predictive marker in familial colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; **18**: 33–37.
[3] ARIYATSU T, MATSUO Y, HARASHIMA A, NAKAMURA S, TAKABA S, TSUBOTA T, ORITA K. Establishment and characterization of „biphenotypic" acute leukemia cell lines with a variant Ph translocation t(9;22;10) (q34;q11;q22). *Hum Cell* 1998; **11**: 43–50.
[4] ATKIN NB. Chromosomal doubling: the significance of polyploidization in the development of human tumors: possibly relevant findings on a lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; **116**: 81–83.
[5] BAILEY SM, MEYNE J, CORNFORTH MN, MC CONNELL TS, GOODWIN EH. A new method for detecting pericentric inversions using COD-FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **75**: 248–253.
[6] BAYANI J, SQUIRE JA. Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. *Clin Genet* 2001; **59**: 65–73.
[7] BEHESHTI B, PARK PC, SWEET JM, TRACHTENBERG J, JEWETT MA, SQUIRE JA. Evidence of chromosomal instability in prostate cancer determined by spectral karyotyping (SKY) and interphase FISH analysis. *Neoplasia* 2001; **3**: 62–69.
[8] BELL RS, WUNDER J, ANDRULIS I. Molecular alterations in bone and soft-tissue sarcoma. *Can J Surg* 1999; **42**: 259–266.
[9] BENTZ M, PLESCH A, STILGENBAUER, DOHNER H, LICHTER P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **21**: 172–173.
[10] BRISSET S, SCHLEIERMACHER G, PETER M, MAIRAL A, OBERLIN O, DELATTRE O, AURIAS A. CGH analysis of secondary genetic changes in Ewing tumors; correlation with metastatic disease in a series of 43 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **130**: 57–61.
[11] BRYANT PE. Mechanisms of radiation-induced chromatid breaks. *Mutat Res* 1998; **404**: 107–111.
[12] CHADWICK KH, LEENHOUTS HP. The Molecular Theory of Radiation Biology. Springer-Verlag, Berlin, 1981
[13] CLOOS J, LEEMANS CR, VAN DER STERRE ML, KUIK DJ, SNOW GB, BRAAKHUIS BJ. Mutagen sensitivity as a biomarker for second primary tumors after head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; **9**: 713–717.
[14] CLOOS J, STEEN I, JOENJE H, KO JY, DEVRIES N, VAN DER STERRE MLT, NAUTA JJP, SNOW GB, BRAAKHUIS BMJ. Association between bleomycin genotoxicity and nonconstitutional risk factors for head and neck cancer. *Cancer Lett* 1993; **74**: 161–165.
[15] DĄBROWSKI P, KITA S, SZYFTER W, SZMEJA Z, JARMUŻ M, SZYFTER K. Ukryta niestabilność chromosomowa a ryzyko wystąpienia raka krtani. *Otolaryngol Pol* 1999; **3**: 245–251.
[16] DĄBROWSKI P, SZYFTER K. Analiza niestabilności chromosomowej pod kątem ryzyka genetycznego wystąpienia raka krtani. *Otolaryngol Pol* 2001; **1**: 13–18.
[17] DEVRIES S, GRAY JW, PINKEL D. Comparative genomic hybridization. [w) Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR [red.]. Current Protocols in Human Genetics. Greene Publishing Associate and John Wiley & Sons, New York 1995.
[18] DOBLES M, LIBERAL V, SCOTT M, BENEZRA R, SORGER PK. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 2000; **101**: 635–645.
[19] DUESBERG P, RAUSCH C, RASNICK D, HEHLMANN R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13692–31697.
[20] DUESBERG P, RASNICK DA. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; **47**: 81–107.
[21] ELLEDGE SJ. Cell cycle checkpoint: preventing an identity crisis. *Science* 1996; **274**: 1664–1672.
[22] ENGEL H, KLEESPIES C, FRIEDRICH J, BREIDENBACH M, KALLEBORN A, SCHÖNDORF T, KOLHAGEN H, MALLMANN P. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancers by molecular cytogenetics. *Brit J Cancer* 1999; **81**, 1165–1173.
[23] FLETCHER JA. Renal and bladder cancers. [w] Wolman SR, Sell S, Totowa NJ [red.] Human Cytogenetic Cancer Markers. Humana Press 1997: 169–202.
[24] GIARETTI W. A model of DNA aneuploidization and evolution in colorectal cancer. *Lab Invest* 1994; **71**: 904–910.

http://rcin.org.pl

[25] GUNAWAN B, MIRZAIE M, SCHULTEN HJ, HEIDRICH B, FUZESI L. Molecular cytogenetic analysis of two primary squamous cell carcinomas of the lung using multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Virchows Arch* 2001; **439**: 85–89.
[26] GUSTASHAW KM. Chromosome stains. [w] Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL [red.] The AGT cytogenetics laboratory manual. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publishers 1997: 259–320.
[27] HEDLEY DW, FRIEDLANDER ML, TAYLOR I, WRUGG CA, MUSGROVE EA. Methods for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathologic material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; **31**: 1333–1335.
[28] HEDLEY DW, RUGG CA, NG AB, TAYLOR IW. Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res* 1984; **44**: 5395–5398.
[29] HESELMEYER-HADDAD K, CHAUDHRI N, STOLTZFUS P, CHENG JC, WILBER K, MORRISON L, AUER G, RIED T. Detection of chromosomal aneuploidies and gene copy number changes in fine needle aspirates is a specific, sensitive and objective genetic test for the diagnosis of breast cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 2365–2369.
[30] HORVATHOVA E, SLAMENOVA D, HLINCIKOVA L, MANDAL TK, GABELOVA A, COLLINS AR. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutat Res* 1998; **404**: 163–171.
[31] HSU TC, CHERRY LM, SAMAAN NA. Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; **17**: 307–313.
[32] HSU TC, JOHNSTON DA, CHERRY LM, RAMKISSOON D, SCHANTZ SP, JESSUP JM, WIN RJ, SHIRLEY L, FURLONG C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer* 1989; **3**: 403–409.
[33] HURET JL, DESSEN P, BERNHEIM A. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. *Nucleic Acid Res* 2001; **29**: 303–304. (http://infobiogen.fr/services/chromcancer/)
[34] ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (red.); S. Karger, Basel, 1995.
[35] JALLEPALLI PV, LENGAUER C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nature Rev* 2001; **1**: 109–117.
[36] JHALA DN, ATKINSON BF, BALSARA GR, HERNANDEZ E, JHALA NC. Role of DNA ploidy analysis in endometrial adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2001; **5**: 267–273.
[37] JIANG F, KATZ RL. Use of interphase fluorescence *in situ* hybridization as a powerful diagnostic tool in cytology. *Diagn Mol Pathol* 2002; **11**: 47–57.
[38] KAHRU R, AHLSTEDT-SOINI M, BITTNER M, MELTZER P, TRENT JM, ISOLA JJ. Chromosome arm-specific multicolor FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; **30**: 105–109.
[39] KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D. Optimising comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **10**: 231–243.
[40] KASHYAP V, BHAMBHANI S. DNA aneuploidy in invasive carcinoma of the uterine cervix. *Indian J Path Microbiol* 2000; **43**: 265–269.
[41] KOŁODZIEJ A, DUŚ D, DĄBROWSKA B, LORENZ J. Ploidia DNA a czas przeżycia pacjentów z guzami pęcherza moczowego. Badania retrospektywne. *Urologia Polska* 1996; **49**: 423–433.
[42] KORABIOWSKA M, BRINCK U, KOTTHAUS I, BERGER H, DROESE M. Analysis of the DNA content in the progression of recurrent and metastatic melanomas. *Anticancer Res* 2000; **20**: 2791–2794.
[43] KRISTAL AR, BAKER MS, FLAHERTY MJ, FENG Z, YLVISAKER TJ, FELD AD, LEVINE DS. A pilot study of DNA aneuploidy in colorectal adenomas and risk of adenoma recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; **4**: 347–352.
[44] LARRAMENDY ML, LUSHNIKOVA T, BJORKQVIST A, WISTUBA II, VIRMANI AK, SHIVAPURKAR N, GAZDAR AF, KNUUTILA S. Comparative genomic hybridization reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; **119**: 132–138.
[45] LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; **396**: 643–649.
[46] LI AT, WANG TT, LUAN XY, WANG MY. High sensitivity to mutagens in healthy blood relatives of laryngeal and hypopharyngeal cancer patients. Head and Neck Cancer-Advances in Basic Research. Elsevier 1996; 3–6.
[47] LI R, SONIK A, STINDL R, RASNICK D, DUESBERG P. Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: Recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Nat.Acad Sci USA* 2000; **97**: 3236–3241.

http://rcin.org.pl

[48] LIMON J, MITELMAN F. Znaczenie aberracji chromosomowych w litych guzach nowotworowych człowieka. *Pat Pol* 1994; **45**: 1–15.
[49] LIMON J. Znaczenie diagnostyczne badań cytogenetycznych guzów nowotworowych tkanek miękkich człowieka. *Nowotwory* 1996; **46**: 275–284.
[50] LUK C, TSAO MS, BAYANI J, SHEPHERD F, SQUIRE JA. Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **125**: 87–99.
[51] MICHEL LS, LIBERAL V, CHATTERJEE A, KIRCHWEGGER R, PASCHE B, GERALD W, DOBLES M, SORGER P, MURTY VVVS, BENEZRA R. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 2001; **409**: 355–359.
[52] MITELMAN F, JOHANSSON B, MANDAHL N, MERTENS F. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; **95**: 1–8.
[53] MITELMAN F, MERTENS F, JOHANSSON B. Recurrent chromosome aberration in cancer. NCI Cancer genome anatomy project 2001; http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/RecurrentAberration].
[54] MITELMAN F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000: **462**: 247–253.
[55] MORGAN WF, CORCORAN J, HARTMANN A, KAPLAN MI, LIMOLI CL, PONNAIYA B. DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat Res* 1998; **404**: 125–128.
[56] NATARAJAN AT, BALAJEE AS, BOEI JJWA, DARROUDI F, DOMINGUEZ I, HANDE MP, MEIJERS M, SLIJEPCEVIC P, VERMEULEN S, XIAO Y. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 1996; **372**: 247–258.
[57] NGUYEN PL, ARTHUR DC, LITZ CE, BRUNNING RD. Fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of trisomy 8 in myeloid cells in chronic myeloid leukemia (CML); a study of archival blood and bone marrow smears. *Leukemia* 1994; **8**, 1654–1662.
[58] NOJIMA H. Cell cycle checkpoints, chromosome stability and the progression of cancer. *Hum Cell* 1997; **10**: 221–230.
[59] NORI D, MERIMSKY O, SAMALA E, SAW D, CORTES E, CHEN E, TURNER JW. Tumor ploidy as a risk factor for disease recurrence and short survival in surgically-treated Duke's B2 colon cancer patients. *J Surg Oncol* 1995; **59**: 239–242.
[60] PALITTI F. Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. *Mutat Res* 1998; **404**: 133–137.
[61] PANDITA TK, HITTELMAN WN. Evidence of chromatin basis for increased mutagen sensitivity associated with multiple primary malignancies of head and neck. *Int J Cancer* 1995; **61**: 733–743.
[62] PAULOVICH AG, TOCZYSKI DP, HARTWELL LH. When checkpoints fail. *Cell* 1997; **88**: 315–321.
[63] PRESSL S, EDWARDS A, STEPHAN G. The influence of age, sex and smoking habits on the background level of fish-detected translocations. *Mutat Res* 1999; **442**: 89–95.
[64] PRESSL S, STEPHAN G. Chromosome translocations detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) – a useful tool in population monitoring? *Toxicol Lett* 1998; **96-97**: 189–194.
[65] PYCHA A, MIAN C, HOFBAUER J, BROSSNER C, HAITEL A, WIENER H, MARBERGER M. Multifocality of transitional cell carcinoma results from genetic instability of entire transitional epithelium. *Urology* 1999; **53**: 92–97.
[66] RABBITS TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; **372**: 143–149.
[67] RABBITS THL. The clinical significance of fusion oncogens in cancer. *N Engl J Med* 1998; **338**: 192–194.
[68] RABER MN, BARLOGIE B. DNA flow cytometry of human solid tumors. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn M [red.] Flow cytometry and sorting. Wiley-Liss, New York 1990: 745–754.
[69] RAJAEE-BEHBAHANI N, SCHMEZER P, RISCH A, RITTGEN W, KAYSER KW, DIENEMANN H, SCHULTZ V, DRINGS P, THIEL S, BARTSCH H. Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001; **95**: 86–91.
[70] RASNICK D. Auto-catalysed progression of aneuploidy explains the Hayflick limit of cultured cells, carcinogen-induced tumours in mice, and the age distribution of human cancer. *Biochem J* 2000; **349**: 497–506.
[71] RIGOLIN GM, BIGONI R, MILANI R, CAVAZZINI F, ROBERTI MG, BARDI A, AGOSTINI P, DELLA PORTA M, TIEGHI A, PIVA N, CUNEO A, CASTOLDI G. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 2001; **15**: 1841–1847.
[72] ROULSTON D, LE BEAU MM. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. [w] Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL [red.] The AGT cytogenetics laboratory manual. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publishers 1997: 325–372.

http://rcin.org.pl

[73] ROWLEY JD. Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction. *Semin Hematol* 2000; **37**: 315–319.
[74] ROY SK, TRIVEDI AH, BAKSHI SR, PATEL SJ, SHUKLA PH, BHATAVDEKAR JM, PATEL DD, SHAH PM. Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes indicates inefficient DNA repair capacity in breast cancer families. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; **19**: 169–173.
[75] ROY SK, TRIVEDI AH, BAKSHI SR, PATEL SJ, SHUKLA PH, BHATAVDEKAR JM, PATEL DD, SHAH PM. Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes indicates inefficient DNA repair capacity in breast cancer families. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; **19**: 169–173.
[76] SAVAGE JRK. A brief survey of aberration origin theories. *Mutat Res* 1998; **404**: 139–157.
[77] SAX K. An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*, *Genetics* 1940; **25**: 41–68.
[78] SCHLADE-BARTUSIAK K, STEMBALSKA-KOZŁOWSKA A, BERNADY M, KUDYBA M, SĄSIADEK M. Analysis of adaptive response to bleomycin and mitomycin C. *Mutat Res* 2002; **513**: 75–81.
[79] SCHROCK E, PADILLA-NASH H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hemat* 2000; **37**: 334–347.
[80] SEYSCHAB H, FRIEDL R, SUN Y, SCHINDLER D, HOEHN H, HENTZE S, SCHROEDER-KURTH T. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 1995; **85**: 2233–2237.
[81] STECCA C, GERBER GB. Adaptive response to DNA-damaging agents: a review of potential mechanisms. *Biochem Pharmacol* 1998; **7**: 941–951.
[82] SUGAI T, UESUGI N, HABANO W, NAKAMURA S, SUTO T, FUJIMAKI E, ITOH C. DNA mapping of gastric cancers using flow cytometric analysis. *Cytometry* 2000; **42**: 270–276.
[83] TROPE C, KAERN J, HOGBERG T, ABELER V, HAGEN B, KRISTENSEN G, ONSRUD M, PETTERSEN E, ROSENBERG P, SANDVEI R, SUNDFOR K, VERGOTE I. Randomized study on adjuvant chemotherapy in stage I high-risk ovarian cancer with evaluation of DNA-ploidy as prognostic instrument. *Ann Oncol* 2000; **11**: 281–288.
[84] TZANCHEVA M, KOMITOWSKI D. Latent chromosomal instability in cancer patients. *Hum Genet* 1997; **99**: 47–51.
[85] VAMVAKAS S, VOCK EH, LUTZ WK. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 1997; **27**: 155–174.
[86] WELKOBORSKY HJ, BERNAUER HS, RIAZIMAND HS, JACOB R, MANN WJ, HINNI ML. Patterns of chromosomal aberrations in metastasizing and nonmetastasizing squamous cell carcinomas of the oropharynx and hypopharynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; **109**: 401–410.
[87] WU X, GU J, HASSAN M, SPITZ MR, BEASLEY RP, HWANG LY. Mutagen sensitivity as a susceptibility marker for human hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; **7**: 567–570.
[88] ZHUANG Z, PARK WS, PACK S, SCHMIDT L, VORTMEYER AO, PAK E. Trisomy 7-harbouring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1998; **20**: 66–69,
[89] ZINCKE H, BERGSTRAHL EJ, LARSON-KELLER JJ, FARROW GM, MYERS RP, LIEBER MM, BARRETT DM, RIFE CC, GONCHOROFF NJ. Stage D1 prostate cancer treated by radical prostatectomy and adjuvant hormonal treatment. Evidence for favorable survival in patients with DNA diploid tumors. *Cancer* 1992; **70**: 311–323.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 28.05.2002 r.
Przyjęto: 31.10.2002 r.
ul. Marcinkowskiego 1, 50-367 Wrocław
sasiadek@gen.am.wroc.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (273–291)

SUPRESJA APOPTOZY W ZAKAŻENIACH CHORDOPOKSWIRUSAMI*

SUPRESSION OF APOPTOSIS IN CHORDOPOXVIRUS INFECTIONS

Małgorzata KRZYŻOWSKA, Marek NIEMIAŁTOWSKI

Pracownia Imunologii, Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii,
Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Streszczenie: Wirusy, w tym pokswirusy, są znane z posiadania mechanizmów umożliwiających im skuteczną ucieczkę przed układem odpornościowym zakażonego gospodarza. Jednym z takich mechanizmów jest możliwość supresyjnego lub indukującego oddziaływania wirusów na programowaną śmierć komórek (apoptozę). W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę zróżnicowanych sposobów supresji apoptozy przez produkty genów niektórych chordopokswirusów (ortopokswirusów, leporipokswirusów i molluscipokswirusów). Do białek biorących udział w supresji apoptozy przez pokswirusy zaliczamy inhibitory kaspaz – serpiny, rozpuszczalne receptory cytokin: IL-1α i β, IL-18, IFN-β i IFN-γ, TNF-α, TNF-β, chemokiny (CC), inhibitory kinazy PKR, v-FLIP oraz białka antyapoptotyczne M11L, MT4 i p28 o zróżnicowanych funkcjach. Dzięki posiadaniu genów, których produkty mogą modyfikować nie tylko przebieg apoptozy, ale i syntezę różnych białek regulatorowych, pokswirusy mogą sprawnie powielać swój genom i adaptować się do zakażonych gospodarzy przez zakłócanie funkcjonowania ich mechanizmów obronnych.

Słowa kluczowe: chordopokswirusy, apoptoza, kaspazy, receptory śmierci, cytokiny, chemokiny.

Summary: General characteristics of proteins encoded by some of the members of *Chordopoxvirinae* (orthopoxviruses, leporipoxviruses and molluscipoxviruses) involved in apoptosis supression has been described in this paper. Proteins involved in poxvirus modulation of apoptosis include: caspase inhibitors – serpins, soluble cytokine (IL-1α , IL-1β, IL-18, IFN-β, IFN-γ, TNF-α, TNF-β) and chemokine (CC) receptors, PKR inhibitors, v-FLIPs and anti-apoptotic proteins of different functions: M11L, MT4 i p28. Due to apoptosis modyfying genes poxviruses are very well adapted to their hosts and can successfully replicate their genom.

Key words: chordopoxviruses, apoptosis, caspases, death receptors, cytokines, chemokines.

*Praca sfinansowana w ramach grantu promotorskiego KBN nr 4P05A11418 oraz *«subsydium dla uczonych»* nr 10/2000 (dla M. Niemiałtowskiego) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

http://rcin.org.pl

Wykaz zastosowanych skrótów: **AIF** *(apoptosis inducing factor)* – czynnik indukujący apoptozę, **Apaf-1** *(dATP/ATP-dependent apoptotic protease activating factor-1)* – zależny od dATP/ATP czynnik aktywujący proteazę, **BPXV** *(buffalopox virus)* – wirus ospy bawołów, **CAD/DFF45** *(caspase-activated DNA-se)* – DNAza aktywowana kaspazami, **CARD** (*caspase recruiting domain*) – domena rekrutująca kaspazę, **Cdk** (*cyclin dependent kinase*) – kinaza zależna od cyklin, **CMLV** (*camelpox virus)* – wirus ospy wielbłądów, **CPXV** (*cowpox virus)* – wirus ospy bydła, **crmA** (*cytokine response modifier A*) – białko modyfikujące odpowiedź na cytokiny, **DED** (*death domain*) – domena śmierci, **DISC** (*death-inducing signalling complex*) – kompleks indukujący śmierć, **dsRNA** (*double-stranded RNA*) – dwuniciowe RNA, **ECTV** *(ectromelia virus*) – wirus ektromelii, **FADD** (*Fas-associated death domain*) – domena śmierci związana z Fas, **FLICE** (*Fas ligand induced caspase enzyme)* – kaspaza aktywowana ligandem Fas, **FLIP** (*FLICE-inhibitory protein*) – białko hamujące FLICE, **GBLV** (*teterapox virus)* – wirus ospy gerbili, **IAP** (*inhibitor of apoptotic protease*) – inhbitor proteaz apoptotycznych, **ICAD** (*inhibitor of caspase-activated DNA-se*) – inhibitor DNAzy aktywowanej kaspazami, **I-κB** – *inhibitor of nuclear factor κB*, inhibitor czynnika transkrypcyjnego κB, **IFN** – interferon, **JAK** (*Janus protein kinase*) – kinaza białkowa Janus, **IL-1** – interleukina 1, **IL-18** – interleukina 18, **MAP3K** (*mitogen-activated protein kinase kinase kinases*) – kinazy kinaz kinaz białkowych aktywowanych mitogenem, **MOCV** (*molluscum contagiosum virus*) – wirus mięczaka zakaźnego, **MPXV** (*monkeypox virus)* – wirus ospy małp, **MYXV** (*myxoma virus*) – wirus myksomatozy, **NF-κB** (*nuclear factor κB*) – czynnik transkrypcyjny κB, **PKR** (*protein kinase RNA-dependent*) – kinaza białkowa zależna od RNA, **RCNV** (*racoonpox virus)* – wirus ospy szopów, **RPXV** (*rabbitpox virus)* – wirus ospy królików, **SKPV** (*skunkpox virus)* – wirus ospy skunksów, **SPI Serp** (*serine protease inhibitor*) – inhibitor proteazy serynowej, **Smac/DIABLO** *(second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI*) – drugi czynnik mitochondrialny, **STAT** *(signal transducers and activators of transcription*) – białka przekazujące sygnały i aktywatory transkrypcji, **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu, **TRADD** *(TNF-receptor-associated death domain*) – domena śmierci związana z TNFR, **TRAIL** (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) – ligand indukujący apoptozę związany z TNF, **UGDV** (*Uasin Gishu disease virus*) – wirus ospy koni, **VACV** (*vaccinia virus*) – wirus krowianki, **VARV** (*variola virus*) – wirus ospy prawdziwej, **VPXV** (*volepox virus*) – wirus ospy myszowatych

1. WSTĘP

Choroby zakaźne ludzi i zwierząt od tysięcy lat stanowią problem zdrowotny i ekonomiczny. W następstwie zapoczątkowanej w latach sześćdziesiątych i konsekwentnie prowadzonej przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organization*, WHO) akcji szczepień (*Intensified Smallpox Eradication Program*) przeciwko ospie ludzkiej, pod koniec lat siedemdziesiątych XX wieku udało się zwalczyć i wyeliminować w skali globalnej tę wyjątkowo groźną chorobę wywoływaną u ludzi przez ortopokswirus ospy prawdziwej (*variola virus*, VARV) [25]. Było to możliwe dzięki temu, że VARV jest chorobotwórczy wyłącznie dla człowieka, u którego nie powoduje zakażeń latentnych, nie ma też rezerwuarów tego wirusa wśród zwierząt, jak również szczepienia przeciwko VARV były w swoim czasie wysoce skuteczne i zapewniły wieloletnią ochronę przed naturalnym zakażeniem tym osobom, które zostały prewencyjnie zaszczepione.

Od epokowego osiągnięcia Edwarda Jennera (1749–1823), jakim było w 1796 roku użycie po raz pierwszy szczepionki (wirus krowianki, *the vaccine*) przeciwko ospie ludzkiej do chwili, kiedy ludzkość odniosła spektakularny sukces w zwalczeniu ospy prawdziwej minęło blisko dwieście lat. Ponowne pojawienie się tej choroby jest jednak

http://rcin.org.pl

możliwe z różnych powodów i to nie tylko wskutek wojny biologicznej lub ataku bioterrorystycznego, ale również możliwego istnienia rezerwuaru tego wirusa w otaczającej nas przyrodzie (patrz publikacje w Science z lat 2000–2002) w tym, na przykład, Martina Enserinka i Richarda Stone [21,65]. Mogłoby to doprowadzić do trudnych do przewidzenia konsekwencji w związku z tym, że większość żyjących obecnie ludzi nigdy nie była objęta programem szczepień przeciwko ospie i nie ma zatem odporności przeciwospowej. Warto nadmienić, że szczepy VARV przechowywane są obecnie w co najmniej dwóch laboratoriach na świecie, to jest w: (i) *US Centers for Diseases Control and Prevention* w Atlancie, GA, USA oraz (ii) *State Research Centers of Virology and Biotechnology* „VECTOR" w Nowosybirsku, Rosja. Z oczywistych względów nie są prowadzone prace z użyciem wymienionych szczepów. W ostatnich latach ukazywały się liczne artykuły dotyczące poważnych zagrożeń wynikających z istnienia tych kolekcji i ewentualnej możliwości celowego lub przypadkowego wprowadzenia VARV do naturalnego gospodarza – człowieka, a co za tym idzie zniweczenia wysiłku wielu pokoleń naukowców i lekarzy w zwalczaniu ospy prawdziwej. Dowodzi to, jak ważnym zagadnieniem jest opracowanie nowych skutecznych szczepionek na podstawie możliwie najpełniejszej znajomości immunobiologii tego wirusa oraz patogenezy ospy prawdziwej. Służy temu, między innymi, precyzyjne określenie komórkowych i molekularnych mechanizmów związanych ze skuteczną odpornością przeciwospową.

Jednym ze szczególnie istotnych procesów towarzyszących chorobom wirusowym jest apoptoza, czyli programowana śmierć komórek (*programmed cell death*, PCD). Dokładne poznanie tego procesu może przyczynić się do pogłębienia naszej wiedzy o biologii VARV i, w konsekwencji, opracowania skutecznych biopreparatów, które zabezpieczą ludzkość przed chorobami wywoływanymi nie tylko przez VARV, ale i inne pokswirusy.

Zespół nasz prowadzi od lat badania, w tym nad apoptozą, na modelowym dla nas ortopokswirusie ektromelii (*ectromelia virus*, ECTV), który wywołuje ospę u genetycznie wrażliwych szczepów myszy o haplotypie H-2^a i H-2^d [24, 39, 47, 62]. Stąd też nasze zainteresowanie apoptozą w zakażeniu wrażliwych gospodarzy również innymi pokswirusami.

2. CHARAKTERYSTYKA POKSWIRUSÓW

W skład rodziny *Poxviridae* wchodzą dwie podrodziny, to jest (ii) *Entomopoxvirinae* (pokswirusy owadów z wydzielonymi trzema rodzajami A, B, C) i (i) *Chordo-poxvirinae*, do której zaliczamy osiem rodzajów wirusów, tj. *Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus* i *Yatapoxvirus*.

Ortopokswirusy mają duży, dsDNA liniowy genom o wielkości między 130 a 280 kb, który koduje od 150 do 300 białek. W wirionie zawartych jest około 100 białek,

http://rcin.org.pl

będących enzymami biorącymi udział w transkrypcji RNA oraz w modyfikacji białek i/lub kwasów nukleinowych. Białka strukturalne wirusa znajdują się w lipidowej osłonce otaczającej dojrzałe cząstki wirusowe. Rodzaj *Orthopoxvirus* obejmuje wirus ospy bawołów (*buffalopox virus*, BPXV), wirus ospy wielbłądów (*camelpox virus*, CMLV), wirus ospy bydła (*cowpox virus*, CPXV), wirus ektromelii – ospy myszy (*ectromelia virus* /ECTV/, *mousepox virus*), wirus ospy małp (*monkeypox virus*, MPXV), wirus ospy królików (*rabbitpox virus*, RPXV), wirus ospy szopów (*racoonpox virus*, RCNV), wirus ospy gerbili (*teterapox virus*, GBLV), wirus krowianki (*vaccinia virus*, VACV), wirus ospy prawdziwej (*variola virus*, VARV), wirus ospy myszowatych (*volepox virus*, VPXV) oraz dwa wirusy o niepewnej przynależności – wirus ospy skunksów (*skunkpox virus*, SKPV) i wirus ospy koni (*Uasin Gishu disease virus*, UGDV), natomiast rodzaj *Leporipoxvirus* obejmuje wirus myksomatozy królików (*myxoma virus*, MYXV), zaś rodzaj *Molluscipoxvirus* obejmuje tylko jeden wirus mięczaka zakaźnego (*molluscum contagiosum*, MOCV), stanowiący poważny problem zdrowotny w AIDS.

Wszystkie pokswirusy replikują się w cytoplazmie. Po adsorpcji wirusa do wrażliwej komórki następuje fuzja jego osłonki z błoną cytoplazmatyczną, po czym rdzeń, zawierający nukleokapsyd uwalniany jest do cytoplazmy, a następnie dochodzi do obnażenia genomu. Wewnątrz rdzenia odbywa się synteza wczesnych transkryptów mRNA, które wraz z polimerazą RNA są wypychane z rdzenia do rybosomów, gdzie zachodzi synteza białek wczesnych wirusa, podczas której następuje wstrzymanie syntezy białek gospodarza. Pokswirusy są jedynymi DNA-wirusami, których cykl replikacyjny odbywa się całkowicie w cytoplazmie. Genom pokswirusów zawiera trzy klasy genów:

- geny wczesne, ulegające ekspresji przed i podczas fazy obnażania genomu, kodujące liczne białka niestrukturalne;
- geny pośrednie, ulegające ekspresji podczas replikacji DNA, kodujące białka regulujące transkrypcję genów późnych i
- geny późne, ulegające ekspresji po okresie replikacji genomu, kodujące większość białek strukturalnych wirusa.

Pewne wczesne geny pokswirusów podlegają transkrypcji pod wpływem wczesnych i późnych promotorów. Niektóre białka wirusowe podlegają modyfikacjom potranslacyjnym (glikozylacji, fosforylacji, rybozylacji, sulfacji, acylacji itp.). Replikacja genomu regulowana jest przede wszystkim przez enzymy wirusowe [12,24].

Zakażenia ortopokswirusami mogą mieć charakter miejscowy lub ogólny. W przebiegu zakażeń miejscowych (VARV, CPXV) wirus replikuje się w komórkach skóry, gdzie powstają typowe krosty ospowe; regionalne węzły chłonne mogą być powiększone, może też wystąpić przejściowo wiremia, jednak wirus nie namnaża się w innych narządach. W przebiegu zakażeń ogólnych, wysypkowych (ECTV lub VARV) wirus replikuje się we wrotach zakażenia, a następnie wraz z krwią (wiremia pierwotna) dostaje się do narządów miąższowych, gdzie przechodzi ponownie cykl replikacyjny. Ponownie uwalniany jest do krwi (wiremia wtórna) i wraz z nią przenoszony jest do skóry, będącej narządem manifestującym w przypadku zakażenia ortopokswirusami.

http://rcin.org.pl

Pojawiają się wówczas charakterystyczne zmiany wysypkowe, które szybko przekształcają się w krosty, przechodzące w owrzodzenia ospowe. Klinicznym objawom choroby może towarzyszyć wysoka śmiertelność (np. w ospie myszy) [12,24,46,47].

Zakażenie pokswirusami prowadzi do zatrzymania normalnego metabolizmu komórki, co zazwyczaj stanowi endogenny sygnał do uruchomienia szlaku śmierci (apoptozy). Wirusy te są bardzo dobrze zaadaptowane do swoich gospodarzy i w toku ewolucji wykształciły mechanizmy umożliwiające im zakończenie długiego, bo około 20-godzinnego, cyklu replikacyjnego, zanim komórka podejmie decyzję o samounicestwieniu. Ponadto dzięki obecności genów, kodujących liczne białka homologiczne do receptorów dla czynników immunomodulacyjnych gospodarza, zakażenie pokswirusami może prowadzić do „uodpornienia" komórki na apoptozę indukowaną egzogennie przez komórki immunologicznie kompetentne [12, 39, 47].

3. APOPTOZA

Apoptoza, inaczej programowana śmierć komórki (*programmed cell death*, PCD), została po raz pierwszy opisana w 1972 przez Kerra, Wyllie'go i Currie'go [36]. Śmierć komórkowa odgrywa istotną rolę w przebiegu prawidłowego rozwoju embrionalnego, utrzymaniu homeostazy organizmów wielokomórkowych oraz jest niezbędna w regulacji procesów, takich jak selekcja negatywna autoreaktywnych limfocytów T w grasicy, jak również usuwanie dojrzałych autoreaktywnych limfocytów T na obwodzie. Supresja procesu śmierci komórkowej może prowadzić do rozwoju nowotworów, chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych. Apoptoza komórek docelowych jest przejawem spontanicznej cytotoksyczności za pośrednictwem komórek NK oraz cytotoksyczności za pośrednictwem antygenowo-swoistych cytotoksycznych limfocytów T (CTL) [50]. Ekspresja pro-apoptotycznych ligandów na powierzchni komórek w komorze przedniej oka oraz na terenie jąder jest związana z występującym tam przywilejem immunologicznym, co prowadzi do apoptozy napływających komórek immunologicznie kompetentnych i ograniczenia, a nawet uniemożliwienia zabijania komórek docelowych także wtedy, gdy są one zakażone wirusem [29,30].

Uruchomienie procesu apoptozy związane jest z działaniem na komórkę czynników uszkadzających i niemożnością naprawy powstałych uszkodzeń. Komórki podlegające apoptozie wykazują szereg charakterystycznych zmian morfologicznych, w tym pączkowanie błony komórkowej, zmniejszenie objętości komórki, kondensację jądra komórkowego oraz tworzenie się związanych z błoną komórkową ciałek apoptotycznych, szybko pochłanianych i fagocytowanych przez sąsiadujące, zdrowe komórki. Zapobiega to uwolnieniu zawartości komórki i rozwojowi zapalenia [52]. Aktywnej, wymagającej energii śmierci komórkowej towarzyszy również fragmentacja DNA, proteoliza białek komórkowych, spadek transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) oraz utrata asymetrii błony komórkowej [50].

http://rcin.org.pl

Wobec tego, że fagocytoza komórek apoptotycznych zapobiega rozwojowi zapalenia oraz opóźnia inicjację swoistej odpowiedzi immunologicznej, regulacja indukcji apoptozy może odgrywać istotną rolę w przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa i w patogenezie chorób wirusowych. Apoptoza w zakażeniach wirusowych jest zwykle nieuniknioną konsekwencją replikacji wirusa i jeśli, jak w przypadku wirusa influenzy (*Orthomyxoviridae*) i alfa-herpeswirusów, jest ograniczona jedynie do pewnych rodzajów komórek, namnażanie wirusa podczas każdego cyklu litycznego może być na tyle wystarczające, że nie stanowi ono przeszkody dla rozwoju choroby i szerzenia się zakażenia. Inne wirusy dysponują sprawnymi mechanizmami zakłócania szlaku apoptozy – dotyczy to w szczególności DNA wirusów o długich cyklach replikacyjnych – adenowirusów, herpeswirusów limfotropowych oraz pokswirusów. Kolejna grupa wirusów – wirusy z rodzaju *Alphavirus*, rodziny *Togaviridae* w toku ewolucji wykształciła mechanizmy umożliwiające wykorzystanie apoptozy w szerzeniu się zakażenia. Wirusy te, w tym wirus Sindbis, synchronizują zakończenie swojego cyklu replikacyjnego z tworzeniem się ciałek apoptotycznych w taki sposób, że cząsteczki wirusowe obecne w ciałkach apoptotycznych są po sfagocytowaniu transportowane do nowych miejsc zakażenia, unikając jednocześnie rozpoznania przez układ odpornościowy [6,18,28,67].

4. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA SZLAKÓW APOPTOTYCZNYCH

Proces programowanej, fizjologicznej śmierci komórki można podzielić na cztery etapy. Najwcześniejsza jest faza inicjatorowa, podczas której komórki otrzymują sygnały, mogące prowadzić do aktywacji PCD. Następna faza obejmuje transdukcję sygnału do systemu bezpośrednich wykonawców śmierci. Trzeci etap to faza efektorowa związana z aktywacją proteaz oraz ich regulatorów. Czwarty, ostatni etap, to okres umierania komórki, podczas którego aktywne proteazy niszczą struktury komórkowe zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, przez aktywację innych enzymów, takich jak CAD/DFF45 [20].

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

(1) prowadzące do aktywacji tzw. receptorów śmierci,
(2) stanowiące zawartość granulosomów komórek cytotoksycznych oraz
(3) uszkadzające bezpośrednio lub będące pośrednim źródłem stresu komórkowego, jak np. związki cytotoksyczne czy też promieniowanie jonizujące lub ultrafioletowe [62].

Receptory śmierci (Fas/CD95, APO-1, TNFR1, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DR6) należą do receptorów z nadrodziny czynnika martwicy nowotworu (TNF) i w części cytoplazmatycznej mają wspólny motyw zwany domeną śmierci (*death domain*, DED). Domeny śmierci tych receptorów są odpowiedzialne za rekrutację

http://rcin.org.pl

cząsteczek adaptorowych, które z kolei wiążą kaspazy (proteazy cysteinowe) tworząc kompleks indukujący śmierć (*death-inducing signalling complex*, DISC) [6,38]. Bodźcem zdolnym do zapoczątkowania apoptozy jest także zawartość ziarnistości uwalnianych przez CTL i komórki NK na powierzchni komórek docelowych w procesie zwanym „pocałunkiem śmierci". Ziarnistości te zawierają między innymi granzym B (fragmentyna-2), będący proteazą serynową, hydrolizującą wiązanie peptydowe po resztach Asp oraz białko zwane perforyną (lub cytolizyną), które polimeryzując powoduje powstawanie porów w błonie komórki docelowej [34, 35, 68]. Przez powstałe pory granzym B wnika do komórki i tnie preferowany substrat – kaspazę-3, która w dalszej kolejności aktywuje kaskadowo pozostałe kaspazy [9, 34]. Ostatnia grupa obejmuje różnorodne czynniki uszkadzające, działające na komórki stresogennie, takie jak: związki cytotoksyczne, promieniowanie jonizujące i nadfioletowe, szok termiczny czy pozbawienie niezbędnych czynników wzrostowych [62]. Wszystkie one wykorzystują wspólny szlak indukcji apoptozy, sprzyjając uwalnianiu składników mitochondrialnych do cytoplazmy [62].

Ze względu na konsekwencje powstania DISC Scaffidi i wsp.[55] zaproponowali podział komórek ulegających apoptozie na dwie grupy. W komórkach typu I pod wpływem DISC powstaje znaczna ilość aktywnej kaspazy-8, która oddziałuje bezpośrednio na kaspazę-3 inicjując fazę efektorową apoptozy. W komórkach typu II powstaje bardzo niewiele kompleksu DISC, a kaskada kaspaz jest amplifikowana przy udziale mitochondriów. Kaspaza-8 tnie pro-apoptotyczne białko BID, należące do rodziny Bcl-2. Fragment C-końcowy BID (tBID) ulega translokacji do mitochondrium, powodując wypływ cytochromu c związany z utratą integralności błony wewnętrznej i zewnętrznej oraz utratą potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$) [42,53]. Utrata potencjału działa jako kofaktor dla czynnika aktywującego proteazę-1 zależnego od dATP/ATP (*dATP/ATP dependent apoptotic protease activating factor-1*, Apaf-1), który tworzy wraz z prokaspazą-9 kompleks, zwany apoptosomem. W dalszej kolejności białko Apaf-1 zmienia swoją konformację przestrzenną, co umożliwia związanie N-końcowej części jego domeny CARD (*caspase-rectruiting domain*) z obszarem CARD prokaspazy-9 (ryc.1) [10]. Oddziaływanie to prowadzi do aktywacji prokaspazy-9, która proteolitycznie tnie kaspazę-3, również związaną z apoptosomem [1, 10]. Wprawdzie mechanizm indukcji wypływu cytochromu-c z mitochondriów nie został dokładnie poznany, ale wiadomo, że biorą w nim udział pro-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2: Bax, Bak, Bad, Bik i Noxa [1, 10]. Innym białkiem mitochondrialnym uwalnianym podczas apoptozy jest Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI*), który jest dimerem wiążącym i neutralizującym hamujące działanie IAP. Prowadzi to do bardziej wydajnej aktywacji kaspazy-3 przy udziale apoptosomu [75].

Wspomniana rodzina białek Bcl-2 jest bezpośrednio zaangażowana w utrzymanie integralności mitochondriów. Do chwili obecnej w obrębie tej rodziny zidentyfikowano 18 białek o działaniu zarówno pro-, jak i anty-apoptotycznym. Większość anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 zawiera C-końcową domenę hydrofobową, która umożliwia ich zakotwiczenie w błonie mitochondrialnej, w błonie jądrowej oraz w

http://rcin.org.pl

siateczce śródplazmatycznej. Białka Bcl-2 i Bcl-X_L działają jako „strażnicy" mitochondrium, hamując uwalnianie cytochromu c i przeciwdziałając kaskadowej aktywacji kaspaz. Pro-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 (Bid, Bax, Bal, Bim i Noxa) są zlokalizowane głównie w cytoplazmie lub są związane z białkami cytoszkieletu. Po zadziałaniu czynników apoptotycznych białka te ulegają translokacji do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie spełniają swoją rolę [1, 5].

Aktywacja kaspaz efektorowych: -3., -6. i -7. zarówno przez bezpośrednie działanie kaspazy-8, jak i przez powstanie funkcjonalnego kompleksu apoptosomu jest wspólnym etapem wszystkich sposobów inicjacji apoptozy. W dalszej kolejności, kaspaza-3. i -7. aktywują zależną od nich DNazę (CAD/DFF40) przez proteolizę jej cyto-plazmatycznego inhibitora ICAD/DFF45, co prowadzi do uwolnienia, aktywacji i translokacji CAD [21]. Po przeniesieniu do jądra komórkowego CAD powoduje internukleosomalną fragmentację DNA na odcinki o długości około 180 pz. Czynnikiem aktywowanym przez kaspazę-3 jest także białko Acinus, wywołujące kondensację DNA, której nie towarzyszy jednak jego fragmentacja. Celem działania kaspaz są również białka cytoszkieletu błony jądrowej – lamininy, gelsolina, cytoplazmatyczny enzym depolimeryzujący aktynę F, α-fodryna i inne [5]. Niezależnie od przedstawionych szlaków apoptozy, związanych z aktywnością białek cytoplazmatycznych, w indukcji PCD aktywnie uczestniczą białka jądrowe, stanowiące czynniki transkrypcyjne, które biorą udział w regulacji cyklu komórkowego [33].

Z badań nad molekularnymi podstawami procesu transformacji nowotworowej wiadomo, że mutacje w genach *p53* i *Rb* powodują zakłócenia cyklu komórkowego oraz czynią komórki niewrażliwymi na indukcję apoptozy. Stres komórkowy, związany z uszkodzeniami DNA, zazwyczaj w postaci pęknięć jednej lub obu nici, stres oksydacyjny oraz aktywacja onkogenów powodują apoptozę indukowaną wzrostem aktywności białka p53. Białko to może w odwracalny sposób zatrzymywać cykl komórkowy w fazie G1, dzięki temu że tworzy połączenia m.in. z białkiem TBF, będącym składową czynnika transkrypcyjnego TFIID. Powstały kompleks blokuje transkrypcję niektórych genów, w tym onkogenów *c-fos* i *c-jun*, których produkty są niezbędne do przebiegu cyklu komórkowego. Prawidłowy przebieg replikacji DNA w komórce uniemożliwia tworzenie w białku p53 takich połączeń [33]. Białko p53 może ponadto indukować apoptozę przez wzrost ekspresji genów kodujących białka będące bezpośrednimi wykonawcami szlaku śmierci: Fas, FasL, DR5, DcR1, Bax i Bcl-X_L [16]. Istnieją również doniesienia o niezależnym od transkrypcji szlaku indukcji apoptozy przez białko p53, wymagającym bezpośrednich oddziaływań typu białko-białko [33].

5. APOPTOZA W PRZEBIEGU PROCESÓW OBRONNYCH

Reakcja obronna w postaci zapalenia oraz rozwój komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej może mieć niekorzystne następstwa w postaci uszkodzeń komórek, tkanek i narządów. Rozwój zapalenia w miejscach uprzywilejowanych

http://rcin.org.pl

immunologicznie stanowi bezpośrednie zagrożenie dla tych obszarów (komora przednia oka, jądra czy trofoblast), dlatego w rozwoju przywileju oprócz mechanizmów, takich jak bariera krew-narząd oraz immunosupresyjnego mikrośrodowiska, ważną rolę odgrywa stała ekspresja na komórkach receptora śmierci – FasL. Obecność białka FasL ogranicza proliferację komórek limfoidalnych Fas^+, które w odpowiedzi na zakażenie pokonują barierę i przedostają się na teren uprzywilejowany, a tym samym chroni narząd przed uszkodzeniem na skutek rozwoju zapalenia [29, 30].

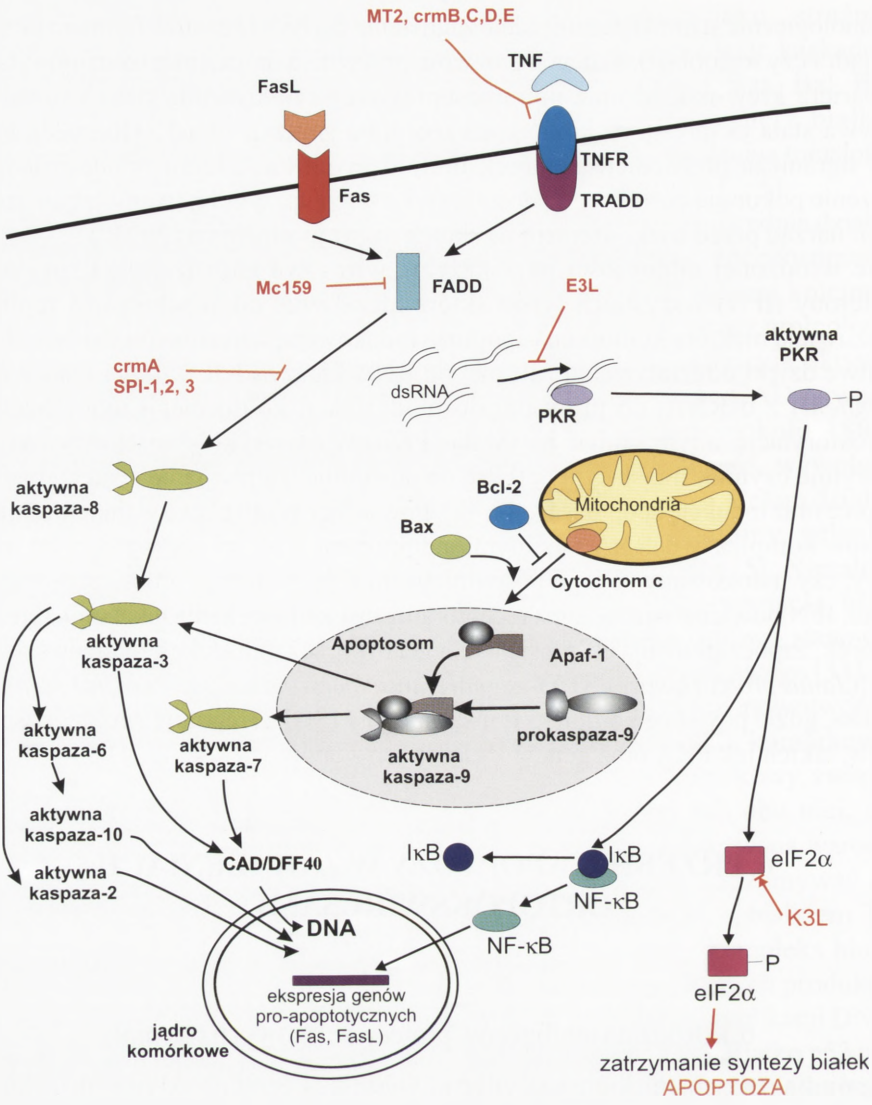
We wrodzonej odporności na zakażenia wirusowe najważniejszą rolę pełnią interferony (IFN) wszystkich typów, które niezależnie od zapobiegania replikacji uwrażliwiają niektóre komórki na apoptozę indukowaną wirusowymi dsRNA. Jest to możliwe dzięki oddziaływaniu zależnej od RNA kinazy PKR (*protein kinase RNA-dependent*) z dsRNA, co prowadzi do modyfikacji konformacji umożliwiającej autofosforylację, a tym samym aktywację PKR. W dalszej kolejności aktywna PKR fosforyluje czynnik translacyjny eIF2α, co powoduje zatrzymanie syntezy białek w komórce oraz indukcję apoptozy [7, 41, 48]. Powstające przejściowo w trakcie replikacji wirusów kompleksy dsRNA są silnymi induktorami IFN. Jak się wydaje, od wirusa zależy, czy indukowany za jego pośrednictwem IFN zainicjuje proces apoptozy czy też nie. IFN bowiem, wiążąc się z receptorami sąsiadujących, niezakażonych jeszcze komórek, zapoczątkowują ekspresję wielu genów przez transdukcję sygnału szlakiem JAK [(*Janus protein kinase*)/STAT (*signal transducers and activators of transcription*)] do jądra, gdzie powstaje kompleks transkrypcyjny ISGF3, regulujący m.in. ekspresję genów, takich jak PKR oraz genów związanych z apoptozą [14, 40, 41].

6. PRZEBIEG APOPTOZY W ZAKAŻENIACH ORTOPOKSWIRUSAMI

6.1. Rodzina inhibitorów proteaz serynowych (serpin)

Serpiny są enzymami, które specyficznie wiążą się z centrum aktywnym niektórych proteaz, tworząc kompleksy nieodwracalnie hamujące ich aktywność. Wirusowe serpiny są homologiczne do serpin ssaków. Najlepiej poznanym enzymem z tej grupy białek jest crmA (*cytokine response modifier A*) wirusa ospy bydła (CPXV) i jego odpowiednik – SPI-2 wirusa krowianki (VACV) (tab. 1). Chociaż crmA jest serpiną, to wykazuje specyficzność zarówno w stosunku do proteaz serynowych (granzym B), jak i do cysteinowych. CrmA blokuje powstawanie IL-1 z prekursora przez hamowanie enzymu konwertującego IL-1β (ICE, kaspaza-1), będącego proteazą cysteinową [19]. Podobną aktywność crmA wykazuje także w stosunku do kaspazy-8 (FLICE), chroniąc komórki przed indukcją apoptozy przy udziale Fas [49]. Serpina ta hamuje również kaspazę- 4, -5, -9 i -10. Na podstawie kinetyki wiązania i powinowactwa ustalono, że kaspazy: -3, -6 i -7 nie stanowią celu działania crmA [17, 19, 49, 71, 76].

http://rcin.org.pl



RYCINA 1. Bezpośrednia regulacja szlaków apoptozy przez produkty genów chordortopokswirusów (opracowanie własne). Kolorem czerwonym oznaczono produkty genów wirusowych oddziałujące z poszczególnymi etapami indukcji sygnału apoptotycznego: crm A – wirusowy inhibitor proteazy serynowej, crm B – homolog receptora TNF typu 1, crm C – homolog receptora TNF typu 2, crm D i crm E – homologi receptora TNF typu 3, E3L – białko wirusowe współzawodniczące z PKR o wiązanie dsRNA, K3L – białko wirusowe wiążące eIF2-α, MC159 – vFLIP, MT-2 – homolog receptora TNF, SPI-1, 2 i 3 – wirusowe inhibitory proteaz serynowych (dalsze objaśnienia – patrz tab. 1 i tekst)

Wirus ospy królików (*rabbit pox virus*, RPXV) koduje serpinę SPI-1 w około 45% podobną do crmA/SPI-2. Miejsce aktywne SPI-1 różni się jednak od tego samego obszaru CrmA, zaś metodą transfekcji wykazano, że SPI-1 nie chroni komórek przed apoptozą indukowaną przez Fas i TNFα [58].

http://rcin.org.pl

Także inne pokswirusy kodują szereg białek o homologicznych funkcjach. Serp2 wirusa myksomatozy (*myxoma virus*, MYXV; rodzaj *Leporipoxvirus*) blokuje kaspazę-1, jednak z mniejszą, niż crmA wydajnością. Wprawdzie rekombinowany CPXV, w którym gen crmA został zastąpiony przez gen Serp-2, nie blokował apoptozy *in vitro*, jednak myksomatoza u królików zakażonych mutantem delecyjnym dla genu Serp-2 przebiegała z mniejszym nasileniem objawów klinicznych w porównaniu z chorobą spowodowaną dzikim szczepem MYXV [70]. Wirus ten koduje jeszcze dwie inne serpiny: Serp-1 i Serp-3. Serp-1 stanowi cząsteczkę przeciwdziałającą rozwojowi zapalenia, zaś Serp-3 jest czynnikiem zjadliwości MYXV [31] (tab. 1).

6.2. Wirusowe homologi c-FLIP

Genom wirusa mięczaka zakaźnego (*molluscum contagiosum virus*, MOCV; rodzaj *Molluscipoxvirus*) zawiera dwie otwarte ramki odczytu ORF (MC159L i MC160L). Każda z nich koduje po dwa powtórzenia DED. MC159L wiąże się z FADD i chroni komórkę przez apoptozą indukowaną przez Fas i TNFα. MC160L nie hamuje apoptozy w warunkach, w jakich hamuje MC159L [55, 69] (tab. 1).

6.3. Homologi komórkowych antyoksydantów

Powstające w komórkach rodniki tlenowe są wysoce toksyczne i mogą indukować apoptozę. Enzymy komórkowe, takie jak peroksydaza glutationowa lub dysmutaza ponadtlenkowa usuwają niebezpieczne rodniki z komórek. Analiza sekwencji MOCV wykazała, że otwarta ramka odczytu MC66 jest w 74% identyczna z ludzką peroksydazą glutationową. MC66 ulega ekspresji jako selenoproteina i chroni komórki przed cytotoksycznym działaniem wolnych rodników i promieniowaniem UV. MC066 nie chroni przed apoptozą indukowaną przez receptory (Fas i TNFR) [56]. Geny VACV, O2L i G4L również kodują dwie funkcjonalne peroksydazy glutationowe [74] (ryc. 1, tab. 1).

6.4. Białka antyapoptotyczne o zróżnicowanych funkcjach

MYXV koduje białko M11L, nie mające komórkowych homologów. M11L stanowi związany z błoną wiroceptor rozpoznający niezidentyfikowany jeszcze zewnątrzkomórkowy ligand, niezbędny w komórkowej odpowiedzi zapalnej. Mutanty delecyjne M11L nie wywołują charakterystycznych objawów ostrej, prowadzącej do śmierci myksomatozy. Ekspresja M11L w hodowlach tkankowych chroni je przed apoptozą indukowaną staurosporyną przez blokowanie aktywacji kaspazy-3 i fragmentacji DNA [23,27]. Kolejnym anty-apoptotycznym białkiem tego wirusa jest M-T4. Białko to znajduje się w retikulum endoplazmatycznym zakażonych komórek i jest jedynym znanym białkiem o takiej lokalizacji hamującym apoptozę [8] (ryc. 1, tab. 1).

ECTV koduje unikalne białko p28, mające wiążący cynk motyw aminokwasowy RING i chroniące komórki HeLa zakażone ECTV przed apoptozą indukowaną UV, lecz niechroniące przed indukcją szlaku śmierci przez receptory Fas i TNF. Czynnik p28 działa na szlaku śmierci powyżej kaspazy-3, podobnie jak serpiny [11] (tab. 1).

http://rcin.org.pl

TABELA 1. Produkty genów ortopokswirusów regulujące apoptozę

Wirus	Białko	Funkcja
ospy krów (CPXV)	CrmA	serpina [21,47,74]
	CrmB	homolog receptora TNF typu 1 [30,55]
	CrmC	homolog receptora TNF typu 2 [55]
	CrmD	homolog receptora TNF typu 3 [41]
	CrmE	homolog receptora TNF typu 3 [49]
	B15	homolog receptora IL-1β [62]
	B8	homolog receptora IFN-γ [3
	B18	homolog receptora IFN-β [3]
	B29R	homolog receptora chemokin CC [7]
	IL-18BP	homolog receptora IL-18 [13,59]
krowianki (VACV)	SPI-1	serpina [18,56]
	SPI-2	jw. [18,69]
	O2L	homolog peroksydazy glutationowej [72]
	G4L	jw. [72]
	E3L	białko wiążące dsRNA [24]
	K3L	białko wiążące eIF2α [38]
	CrmB	homolog receptora TNF typu 1 [41,55]
	CrmC	homolog receptora TNF typu 2 [55]
	CrmD	homolog receptora TNF typu 3 [41]
	B15-homolog	homolog receptora IL-1β [13,62]
	B8-homolog	homolog receptora IFN-γ [3]
	B18-homolog	homolog receptora IFN-β [3,16]
	B29R-homolog	homolog receptora chemokin [4]
	IL-18BP	homolog receptora IL-18 [13,59]
myksomatozy (MYXV)	Serp-1	serpina [68,29]
	Serp-2	jw. [68]
	Serp-3	jw. [29]
	M11L	wiroceptor o nieznanej funkcji [22,25]
	M-T2	homolog receptora TNF [52]
	MT7	rozpuszczalny receptor INF-γ [43]
molluscum contagiosum (MOCV)	MC159	hamuje aktywację kaspazy-8 (vFLIP) [67]
	MC066	homolog peroksydazy glutationu [54]
	mc148	homolog chemokin typu CC [35,42]
	MT7	homolog receptora chemokin [45]
	MC054	rozpuszczalny receptor IL-18 [13,59]
ospy myszy (ECTV)	SPI-1	serpina [71]
	SPI-2	jw. [70]j
	SP-3	jw. [71]
	CrmD	homolog receptora TNF typu 2 [41]
	CrmE	homolog receptora TNF typu 3 [49]
	IL-1BP	homolog receptora IL-1β [13,62]
	B-8	homolog receptora IFN-γ [57,58]
	B-18	homolog receptora IFN-β [57,58]
	B29R	homolog receptora chemokin [3,58]
	IL-18BP	homolog receptora IL-18 [13,59]
	p28	czynnik chroniący przed apoptozą indukowaną przez UV [11]

http://rcin.org.pl

6.5. Inhibitory kinazy białkowej PKR

VACV ma dwa geny, K3L i E3L, których produkty oddziałują na apoptozę za pośrednictwem PKR. E3L koduje białko wiążące dsRNA i współzawodniczące z PKR o związanie dsRNA. Produkt genu K3L współzawodniczy z czynnikiem transkrypcyjnym eIF2α o związanie się z PKR, prowadząc do redukcji poziomu fosforylowanego eIF2α w komórkach zakażonych VACV. Ponadto, produkt genu E3L jest bezpośrednim inhibitorem indukowanej IFN syntazy 2-5A [6,26,40] (tab. 1, ryc. 1).

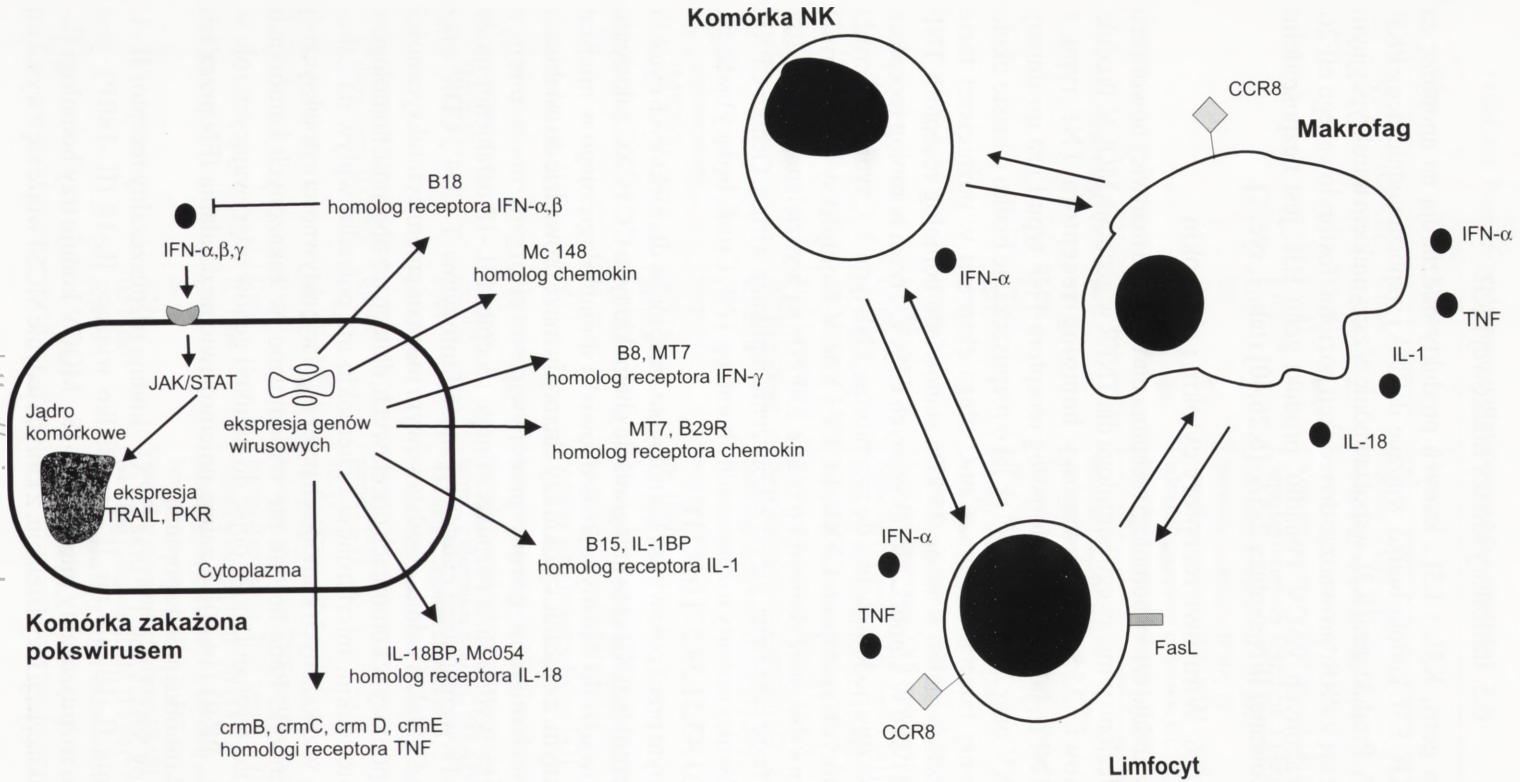
6.6. Wirusowe receptory cytokin i chemokin

Ortopokswirusy kodują cztery homologi receptora dla czynnika martwicy nowotworu (vTNFR). Nie znaleziono wirusowego homologa dla TNFR w genomie MOCV. Produkt genu crmB stanowi 355-aminokwasowy homolog receptora TNF typu 1 i wiąże zarówno TNFα, jak i TNFβ. Homolog receptora TNF typu I jest uwalniany z zakażonych CPXV oraz MYXV komórek jako rozpuszczalne białko o masie około 48 kDa we wczesnej fazie zakażenia. CrmC ulega ekspresji w późniejszej fazie i koduje rozpuszczalne białko o masie 25 kDa stanowiące homolog receptora TNF typu 2 wydzielane tylko w komórkach zakażonych CPXV. Trzeci homolog receptora TNF-u, crmD wykazuje podobieństwo do receptorów TNF typu 3. Czynny gen crmD występuje w niektórych szczepach CPXV, ECTV i VACV. Kompleksy białka CrmD połączone mostkami dwusiarczkowymi o masie 250 kDa są wydzielane na zewnątrz komórki w późnej fazie zakażenia, już po zakończeniu replikacji wirusa. Genom CPXV i ECTV zawiera również czwarty rozpuszczalny homolog TNF, CrmE, będący białkiem o masie 18 kDa [31,43,51,54,57] (ryc. 1).

Dzięki kodowanym przez pokswirusy homologom receptorów dla niektórych cytokin (IL-1 i IL-18) i chemokin (CC) oraz antagoniście chemokin typu CC i CXC zakażenie tymi wirusami prowadzi do zmiany mikrośrodowiska immunologicznego w miejscu zakażenia. Tym samym, związanie cytokin czy chemokin może prowadzić do osłabienia podstawowych mechanizmów obrony przeciwwirusowej organizmu w miejscu zakażenia, np. przez wydzielanie rozpuszczalnego receptora IL-18 osłabieniu może ulec działanie IL-18 wzmagające cytotoksyczność limfocytów T $CD4^+$, $CD8^+$ oraz komórek NK (ryc. 2). Jak wiadomo, podstawowym mechanizmem cytotoksyczności jest indukowanie apoptozy w komórkach docelowych, dlatego też obecność homologów dla receptorów interleukin, interferonów i chemokin ma pośredni wpływ na zahamowanie apoptozy w zakażonych komórkach przez regulację aktywności cytotoksycznej odpowiednich komórek. Ponadto, jak już wspomniano, w zakażonych komórkach stymulowanych interferonami może dojść do indukcji genów odgrywających rolę w apoptozie (TRAIL, PKR) [14,40], a zatem uniemożliwienie działania IFN przez ich związanie chroni komórkę przed apoptozą.

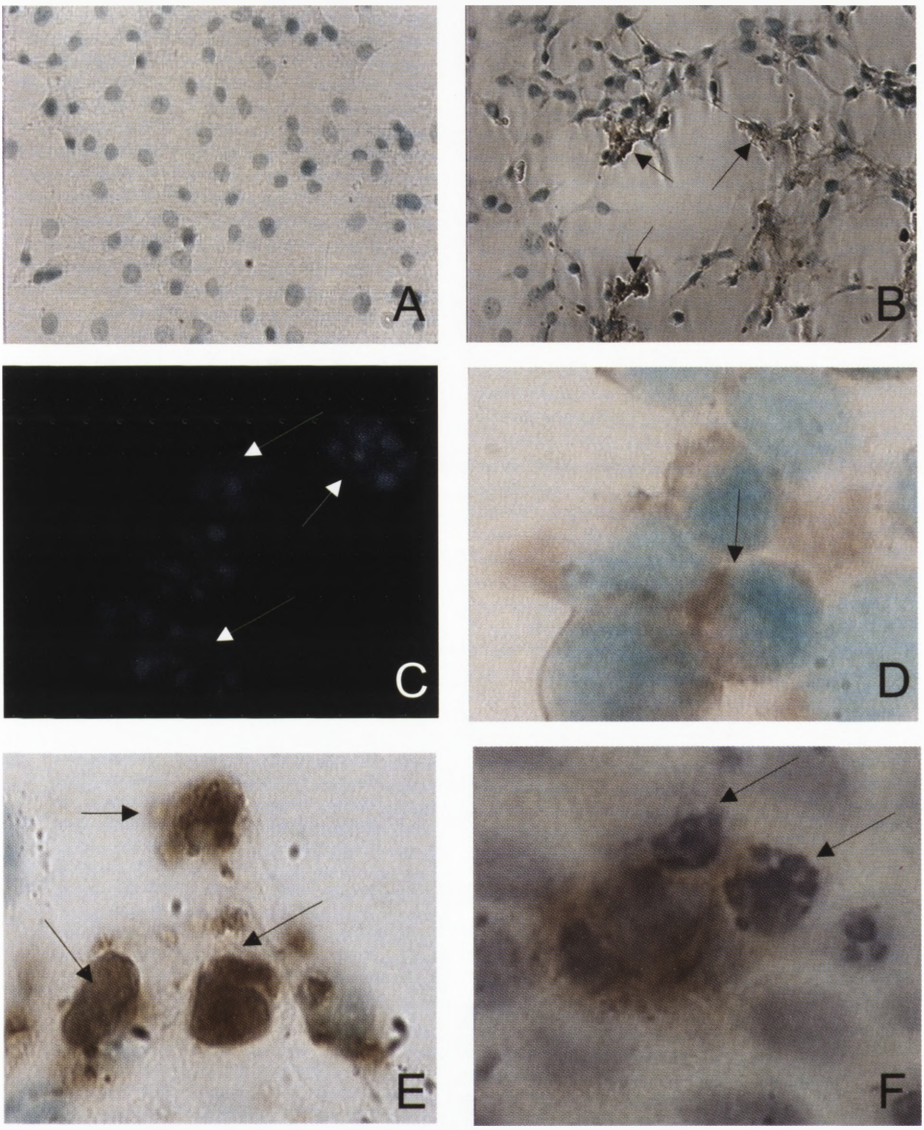
Niektóre szczepy VACV, ECTV oraz CPXV kodują rozpuszczalny receptor IL-1, zdolny do wiązania IL-1β, ale nie IL-1α. Białko wiążące IL-18 (IL-18BP) jest produkowane jako rozpuszczalny inhibitor IL-18. MOCV koduje trzy homologi IL-18BP ulegające glikozylacji i wydzielaniu, z których jedynie MC54 wiąże się z wysokim

http://rcin.org.pl



RYCINA 2. Pośrednia regulacja szlaków apoptozy przez produkty genów chordopokswirusów (opracowanie własne). CCR8 – receptor dla chemokin typu CC, PKR – kinaza białkowa zależna od dsRNA, TRAIL – ligand indukujący apoptozę związany z TNF (pozostałe objaśnienia – patrz tab. 1 i tekst)

http://rcin.org.pl



RYCINA 3. Apoptoza w zakażeniu ECTV (badania własne). (A) komórki L929 kontrolne, niezakażone, poddane reakcji TUNEL, wykrywającej wolne końce 3' –OH w komórkach apoptotycznych, pow. oryg. 100x; (B) komórki L929 zakażone ECTV w 18 g.p.z., poddane reakcji TUNEL, pow. oryg. 100x; (C) komórki L929 zakażone ECTV w 18 g.p.z., poddane barwieniu Hoechst 33342 w stężeniu 1 μg/ml i obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym, pow. oryg. 1000x; (D) komórki L929 zakażone ECTV w 18 g.p.z., poddane barwieniu za pomocą przeciwciała monoklonalnego anty-cytokeratyna-18, wykrywającego aktywność enzymów efektorowych apoptozy – kaspazy-3 i –7, pow. oryg. 1000x; (E) komórki śledziony myszy BALB/c zakażonych dostopowo ECTV w 10 d.p.z. poddane reakcji TUNEL, pow. oryg. 1000x; (F) komórki śledziony myszy BALB/c zakażonych dostopowo ECTV w 10 d.p.z. poddane barwieniu przeciwciałami monoklonalnymi anty-CD8, pow. oryg. 1000x (strzałkami oznaczono komórki apoptotyczne)

http://rcin.org.pl

powinowactwem do IL-18 i hamuje produkcję IFN-γ [4,12,13,60,61,64]. Pozostałe homologi białek receptorowych to rozpuszczalne homologi receptorów IFN-γ, dla których geny znajdują się w genomie VACV, ECTV i CPXV. Ponadto, produkt genu MT7 MYXV również stanowi rozpuszczalny receptor IFN-γ. Rozpuszczalny receptor IFN VACV wykazuje homologię sekwencji z zewnątrzkomórkową domeną wiążącą IFN-γR [15,46,59,60].

Ostatnią grupę pokswirusowych homologów receptorów stanowią homologi receptorów dla chemokin, kodowane przez niektóre szczepy CPXV, MYXV, ECTV oraz VACV. Produkowane przez nie rozpuszczalne białko o masie 35 kDa wiąże CC(β), ale nie wiąże CXC(β) i C(γ). Niezależnie od tego, białko M-T7 MOCV ma również zdolność do wiązania niektórych chemokin. Genom MOCV zawiera ponadto gen *mc148*, kodujący homolog chemokin, który hamuje chemotaksję monocytów i neutrofilów indukowaną przez CC lub CXC. Tym samym, produkt genu mc148 stanowi antagonistę tych chemokin [4,37,44,60] (tab. 1).

7. PODSUMOWANIE

Fagocytoza ginących komórek zapobiega rozwojowi odpowiedzi zapalnej i inicjacji swoistej odpowiedzi immunologicznej, dlatego też regulacja indukcji apoptozy ma istotne znaczenie dla cyklu replikacyjnego wirusa oraz przebiegu zakażeń wirusowych. Pokswirusy modulują apoptozę dzięki kodowanym przez nie białkom, które naśladują lub modulują działanie kluczowych regulatorów apoptozy, takich jak m.in. kaspazy, białka c-FLIP. Ponadto, genom pokswirusów zawiera szereg genów, których produkty modyfikują odpowiedź humoralną gospodarza, w tym białek dopełniacza, czynników wzrostowych i cytokin. Pogłębienie naszej wiedzy o molekularnych szlakach apoptozy i roli tego procesu w zakażeniu pokswirusami może przyczynić się do opracowania nowoczesnych szczepionek przeciwko ospie prawdziwej i zakażeniom innymi chordopokswirusami.

PIŚMIENNICTWO

[1] ADAMS JM, COREY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281**: 1322–1326.
[2] ALCAMI A, SMITH GL. A soluble receptor for interleukin-1β encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 1992; **71**: 153–167.
[3] ALCAMI A, SMITH GL. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* 1995; **69**: 4633–4639.
[4] ALCAMI A, SYMONS JA, COLLINS PD, WILLIAMS TJ, SMITH GL. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J Immunol* 1998; **160**: 624–633.
[5] ANTONSSON B, MARTINOU J-C. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; **256**: 50–57.
[6] ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305–1308.
[7] BARGER GN. Host defence, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **8**:113–136

http://rcin.org.pl

[8] BARRY M, HNATIUK S, MOSSMAN K, LEE S-F, BOSHKOV L, MCFADDEN G. The myxoma virus M-T4 gene encodes a novel RDEL-containing protein that is retained within the endoplasmic reticulum and is important for the productive infection of lymphocytes. *Virology* 1997; **239**: 360–377.
[9] BLINK EJ, TRAPANI JA, JANS DA. Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: A central role in the nuclear events of granule-exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 206–215.
[10] BRENNER C, KROEMER G. Apoptosis. Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 2000; **289**: 1150–1151.
[11] BRICK DJ, BURKE RD, MINKLEY AA, UPTON C. Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *J Gen Virol* 2000; **81**:1087–1097.
[12] BULLER ML, PALUMBO GJ. Poxvirus pathogenesis. *Microb Rev* 1991; **55**: 80–132.
[13] CALDERARA S, XIANG Y, MOSS B. Orthopoxvirus IL-18 binding proteins: affinities and antagonistic activities. *Virology* 2001; **279**: 22–26.
[14] CHIN YE, KITAGAWA M, KUIDA K, FLAVELL RA, FU XY. Activation of the STAT-signaling pathway can cause expression of caspase-1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5328–5337.
[15] COLAMONICI OR, DOMANSKI P, SWEITZER SM, LAMER A, BULLER RML. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J Biol Chem* 1995; **270**: 5974–15978.
[16] DIDIER M, BURSZTAJN S, ADAMEC E, PASSANI L, NIXON RA, COYLE JT, WEI JT, BERMAN SA. DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitoxicity in primary neuronal cultures. *J Neurosci* 1996; **16**: 6135–6133.
[17] DOBBELSTEIN M, SHENK T. Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J Virol* 1996; **70**: 6479–6485.
[18] DOCKERELL DH. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *J Infec* 2001; **42**: 227–234.
[19] ENARI M, HUG H, NAGATA S. Involvement of an ICE-like protease in Fas- mediated apoptosis. *Nature* 1995; **375**: 78–81.
[20] 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.
[21] ENSERINK M. How devastating would a smallpox attack really be? *Science* 2002; **296**: 1592–1595.
[22] ENSERINK M, STONE R. Dead virus walking. *Science* 2002; **295**: 2001–2005.
[23] EVERETT H, BARRY M., LEE SF, SUN XJ, GRAHAM K, STONE J, BLEACKLEY RC, MCFADDEN G. M11L: A novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. *J Exp Med* 2000; **191**: 1487–1498.
[24] FENNER FR, BULLER RML. Mousepox. [w]: Nathanson N [red.] Viral pathogenesis. 1997: 535–553.
[25] FENNER F, WITTEK, R, DUMBELL, K.R. 1989. The Orthopoxviruses. Academic Press, Inc., San Diego.
[26] GIL J, ALCAMI A, ESTEBAN M. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1999; **9**: 4653–4663.
[27] GRAHAM KA, OPGENORTH A, UPTON C, MCFADDEN G. Myxoma virus M11L-ORF encodes a protein for which cell surface localization is critical in manifestation of viral virulence. *Virology* 1992; **191**: 113–134.
[28]GRANVILLE DJ, CERTHY CM, YANG D, HUNT DWC, MCMANUS BM. Interaction of viral proteins with host cell death machinery. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 653–659.
[29] GREEN DR, WARE CF. Fas-ligand: privilege and peril. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6986–5990.
[30] GRIFFITH TS, FERGUSON TA. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today* 1997; **18**: 240–244.
[31] GUERIN JL, GELFI J, CAMUS C, DELVERDIER M, WHISSTOCK JC, AMARDEIHL MF, PY R, BERTAGNOLI S, MESSUD-PETIT F. Characterization and functional analysis of Serp3: a novel myxoma virus-encoded serpin involved in virulence. *J Gen Virol* 2001; **82**: 1407–1417.
[32] HU FQ, SMITH CA, PICKUP DJ. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* 1994; **204**: 343–356.
[33] HUANG LC, CLARKIN KC, WAHL GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4827–4832.
[34] JU ST, MATSUI K, OZDEMIRLI M. Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. *Int Rev Immunol* 1999; **18**: 485–492.

http://rcin.org.pl

[35] KAM CM, HUDIG D, POWERS JC. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 307–323.
[36] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1980; **26:** 239–257.
[37] KRATHWOHL MD, HROMAS R, BROWN DR, BROXMEYER HE, FIFE KH. Functional characterization of the C-C chemokine-like molecules encoded by molluscum contagiosum virus types 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 9875–9880.
[38] KRZYŻOWSKA M, FARIDEH S, DE MILITO A, MISSAILIDIS C, SCHOLLENBERGER A, NIEMIAŁTOWSKI MG, CHIODI F. Cross-linking of LFA-1 molecule enhances Fas mediated apoptosis of Jurkat and Burkitt lymphoma cell lines. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1123–1124.
[39] KRZYŻOWSKA M, SCHOLLENBERGER A, NIEMIAŁTOWSKI MG. Apoptosis during ectromelia orthopoxvirus infection is DEVD-ases dependent: *in vitro* and *in vivo* studies. *Microb Infect* 2002; **4**: 599–611.
[40] LEE SB, ESTEBAN M. The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 1994; **199**: 491–496.
[41] LENGYEL P. Double-stranded RNA and interferon action. *J Interferon Res* 1987; **7**: 511–519.
[42]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.
[43] LOPAREV VN, PARSONS JM, KNIGHT JC, PANUS JF, RAY CA, BULLER, RML, PICKUP, DJ. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc Natl Acad Sci* USA 1998; **95**: 3786–3791.
[44] LUTTICHAU HR, STINE J, BOESEN TP, JOHNSEN AH, CHANTRY, D, GERSTOFT, J, SCHWARTZ, TW. A highly selective CC chemokine receptor (CCR)R antagonist encoded by the poxvirus molluscum contagiosum. *J Exp Med* 2000; **191**: 171–179.
[45] MOSSMAN K, NATION P, MACEN J, GARBUTT M, LUCAS A, MCFADDEN, G. Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-γ receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology* 1996; **215**: 17–30.
[46] NIEMIALTOWSKI MG, SPOHR DE FAUNDEZ I, GIERYNSKA M, MALICKA E, TOKA FN, SCHOLLENBERGER A, POPIS A. The inflammatory and immune response to mousepox (infectious ectromelia) virus. *Acta Virol* 1994; 38: 299–307.
[47] NIEMIALTOWSKI MG, TOKA FN, MALICKA E, SPOHR DE FAUNDEZ I, GIERYNSKA M, SCHOLLENBERGER A. Orthopoxviruses and their immune escape. *Rev Med Virol* 1997; **7**: 45–47.
[48] PITHA PM, LOWTHER W, JUANG YT, SCHAFER SL, BURYSEK L, HISCOTT J, MOORE PA. Role of interferon regulatory factors (IRFs) in virus-mediated signalling and regulation of cell growth. *Biochimie* 1998; **80**: 651–658.
[49] QUAN, LT, CAPUTO, A, BLEACKLEY RC, PICKUP DJ, SALVESEN, GS. Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10377–10379.
[50] RATHMELL JC, THOMPSON CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 781–828.
[51] SARAIVA M, ALCAMI A. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J Virol* 2001; **75**: 226–233.
[52] SAVILL J, FADOK V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; **407**: 784–788.
[53] SCAFFIDI, C, SCHMIT I, ZHA J, KORSMEYER SJ, KRAMMER PH, PETER PE. Differential modulation of apoptosis sensivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22532–22538.
[54] SEDGER L, MCFADDEN G. M-T2: A poxvirus TNF receptor homologue with dual activities. *Immunol Cell Biol* 1996; **74**: 538–545.
[55] SENKEVICH TG, BUGERT JJ, SISLER JR, KOONIN EV, DARAI G, MOSS B. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. *Science* 1996; **273**: 813–816.
[56] SHISLER JL, SENKEVICH TG, BERRY MJ, MOSS B. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. *Science* 1998; **279**:102–105.
[57] SMITH CA, HU FQ, SMITH TD, RICHARDS CL, SMOLAK P, GOODWIN RG, PICKUP DJ. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* 1996; **223**:132–147.

http://rcin.org.pl

[58] SMITH GL, HOWARD ST, CHAN YS. Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine proteinase inhibitors. *J Gen Virol* 1989; **70**: 2333–2343.
[59] SMITH VP, ALCAMI A. Inhibition of interferons by ectromelia virus. *J Virol* 2002; **76**: 1134–1134.
[60] SMITH VP, ALCAMI A. Expression of secreted cytokine and chemokine inhibitors by ectromelia virus. *J Virol* 2000; **74**: 8460–8471.
[61] SMITH VP, BRYANT NA, ALCAMI A. Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *J Gen Virol* 2000; **81**:1323–1330.
[62] SOLARY E, PLENCHETTE S, SORDET O, REBE C, DUCOROY P, FILOMENKO R, BRUEY JM, DROIN N, CORCOS L. Modulation of apoptotic pathways triggered by cytotoxic agents. *Therapie* 2001; **5**: 511–518.
[63] SPOHR CESPEDES I, TOKA FN, SCHOLLENBERGER A, GIERYNSKA M, NIEMIALTOWSKI MG. Pathogenesis of mousepox in H-2d mice: evidence for MHC class I-restricted CD8+ and MHC class II-restricted CD4+ CTL antiviral activity in the lymph nodes, spleen and skin, but not in conjunctivae. *Microb Infect* 2001; **3**:1063–1072.
[64] SPRIGGS MK, HRUBY DE, MALISZEWSKI CR, PICKUP DJ, SIMS JE, BULLER RML, VANSLYKE J. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted Interleukin-1-Binding protein. *Cell* 1992; **71**:145–152.
[65] STONE R. WHO Puts off Destruction of US, Russian Caches. *Science* 2002; **295**: 598–599.
[66] TANIGUCHI T, TANAKA N, TAKI S. Regulation of interferon system, immune responce and oncogenesis by the transcription factor interferon regulatory factor-1. *Eur Cytokine Netw* 1998; **9**: 43–48.
[67] TEODORO JG, BRANTON PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997; **71**: 1739–1746.
[68] TRAPANI JA, DAVIS J, SUTTON VR, SMYTH MJ. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents *in vitro* and *in vivo*. *Curr Opin Immunol* 2000; **13**: 323–329.
[69] TSUKUMO SI, YONEHARA S. Requirement of cooperative functions of two repeated death effector domains in caspase-8 and in MC159 for induction and inhibition of apoptosis, respectively. *Genes Cells* 1999; **4**: 541–549.
[70] TURNER PC, SANCHO MC, THOENNES SR, CAPUTO A, BLEACKLEY RC, MOYER RW. Myxoma virus Serp2 is a weak inhibitor of granzyme B and interleukin-1 beta-converting enzyme *in vitro* and unlike CrmA cannot block apoptosis in cowpox virus-infected cells. *J Virol* 1999; **73**: 6394–6404.
[71] TURNER S, KENSHOLE B, RUBY J. Viral modulation of the host response via crmA/SPI-2 expression. *Immunol Cell Biol* 1999; **77**: 236–241.
[72] TURNER SJ, SILKE J, KENSHOLE B, RUBY J. Characterization of the ectromelia virus serpin, SPI-2. *J Gen Virol* 2000; **81**: 2425–2430.
[73] WALLICH R, SIMON MM, MULLBACHER A. Virulence of mousepox virus is independent of serpin-mediated control of cellular cytotoxicity. *Viral Immunol* 2001; **14**: 71–81.
[74] WHITE CL, SENKEVICH TG, MOSS B. Vaccinia virus G4L glutaredoxin is an essential intermediate of a cytoplasmatic disulphide bond pathway required for virion assembly. *J Virol* 2002; **76**: 467–472.
[75] WU G, CHAI J, SUBER TL, WU JW, DU C, WANG X, SHI Y. Structural basis for IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; **408**: 1008–1013.
[76] ZHOU Q, SNIPAS S, ORTH K, MUZIO M, DIXIT VM, SALVESEN GS. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7797–7800.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 22.08. 2002 r.
Przyjęto: 25.11.2002 r.
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (293–310)

ZESPÓŁ SMITHA, LEMLEGO I OPITZA W BADANIACH KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I MOLEKULARNYCH*

SMITH-LEMLI-OPITZ SYNDROME IN CLINICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR STUDIES

Elżbieta CIARA, Ewa POPOWSKA, Małgorzata KRAJEWSKA-WALASEK

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka", Warszawa- Międzylesie

Streszczenie: Zespół Smitha, Lemlego i Opitza (SLOS, MIM 27400) jest chorobą autosomalną recesywną. Charakteryzuje ją opóźnienie rozwoju umysłowego, zmieniony wygląd twarzy i liczne nieprawidłowości w budowie wielu narządów. Przyczyną licznych wad jest deficyt aktywności reduktazy 7-dehydrocholesterolu (DHCR7), enzymu, który katalizuje ostatni etap biosyntezy cholesterolu. Ostatnio wykryto, że cholesterol odgrywa kluczową rolę w rozwoju embrionalnym organizmu przez regulację działania białek sygnalnych (*sonic hedgehog*, SHH). Zespół SLO występuje z częstością 1:60000 do 1:10000. Gen *DHCR7* kodujący białko reduktazy został zlokalizowany na chromosomie 11 w pozycji q13. Według dotychczasowych doniesień znanych jest ponad 90 różnych mutacji w genie *DHCR7*. Większość mutacji stanowią jednonukleotydowe substytucje (90%). Bardzo rzadko występują mutacje typu delecji i insercji (10%). Podejmowane są próby ustalenia korelacji między genotypem a fenotypem choroby. Łagodne objawy kliniczne u chorych (typ I SLO) wywoływane są przez mutacje zmieniające informację kodonu. Ciężka postać choroby (typ II SLO) jest związana z mutacjami zmieniającymi ramkę odczytu i wprowadzającymi kodon terminacyjny, które całkowicie znoszą aktywność białka enzymatycznego.

Słowa kluczowe: zespół Smitha, Lemlego i Opitza, reduktaza 7-dehydrocholesterolu, gen *DHCR7*, białka *sonic hedgehog*.

Summary: Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS, MIM 270400) is an autosomal recessive disorder, characterized by facial dysmorphisms, mental retardation and multiple congenital anomalies. Biochemically, the disorder is caused by deficient activity of 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7). Cholesterol plays an important role in early embryonic development probably via the function of specific gene products, such as sonic hedgehog (SHH) signaling proteins. The frequency of SLOS is calculated

*Praca częściowo finansowana w ramach projektu badawczego KBN nr 4P05E 09118 oraz programu Subsydia dla Uczonych 2000 ustanowionego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.

http://rcin.org.pl

to be 1:60000 to 1:10000. The 7-dehydrocholesterol reductase gene (Δ7 sterol reductase gene, *DHCR7*) was identified on chromosome 11 in region q13. Up to now 93 different mutations. and have been described in the translated exons 3–9. The mutations are mostly nucleotide substitutions (90%). Insertions and deletions are not so frequent (10%) and were identified in the nine families. The clinical severity scores were correlated with mutation classes. The mildest clinical SLOS phenotypes (SLOS type I) were associated with missense mutations and the severe phenotypes (SLOS type II) were associated with splice site and nonsense mutations as well as missense mutations located in the C-terminal domain (CT).

Key words: Smith-Lemli-Opitz syndrome, 7-dehydrocholesterol reductase, *DHCR7* gene, sonic hedgehog proteins.

Zespół Smitha, Lemlego i Opitza (SLO, MIM 270400) został wyodrębniony w 1964 r. [59] i wstępnie nazwany przez swoich odkrywców zespołem RSH (od inicjałów imion pierwszych trzech pacjentów). Dziedziczony jest w sposób autosomalny recesywny. Oboje rodzice chorego dziecka są nosicielami uszkodzonego genu na jednym allelu i nie wykazują objawów choroby, a prawdopodobieństwo urodzenia kolejnego chorego dziecka wynosi 25%.

SLOS jest rzadkim przykładem monogenowego uwarunkowania zespołu mnogich wad wrodzonych, które zazwyczaj powstają w wyniku aberracji chromosomowych [53].

DIAGNOSTYKA KLINICZNA

Dziecko z zespołem SLO rodzi się z ciąży o zupełnie prawidłowym przebiegu. Poród (w 75%) odbywa się po 40–42 tygodniach ciąży [53, 59]. U noworodków stwierdza się brak odruchu Moro oraz zmienne napięcie mięśniowe (początkowo wiotkość, a następnie wzmożenie napięcia mięśniowego) [31, 32]. U większości noworodków (90%) występują zaburzenia w działaniu układu pokarmowego (brak odruchu ssania, nieprawidłowości w połykaniu, wymioty, biegunka czy zaparcia) [16, 59].

Zaburzenia wzrastania, zwłaszcza słaby przyrost masy ciała, opóźnienie rozwoju umysłowego (u 100% pacjentów) oraz małogłowie (u > 90% pacjentów) należą do jednych z najbardziej charakterystycznych i stałych objawów choroby [32, 33]. Ponadto obserwuje się opóźnienie rozwoju psychoruchowego, wyraźnie charakterystyczny wygląd twarzy (m.in. opadanie powiek, zadarty nos, nisko osadzone uszy, mała żuchwa), wady w ukształtowaniu kończyn (m.in. syndaktylia 2. i 3. palca u stóp), wady serca (najczęściej przetrwały kanał przedsionkowo-komorowy) i przewodu pokarmowego (choroba Hirschsprunga, zwężenie odźwiernika), zaburzenia neurologiczne, a u chłopców nieprawidłowości w budowie narządów płciowych (obojnactwo rzekome męskie, wnętrostwo) [3, 6, 9, 19, 33, 34, 37, 47]. W trakcie życia płodowego obserwowana jest niedostateczna synteza hormonów nadnerczy, utrzymująca się również po urodzeniu dziecka [15]. Znajduje to odbicie w niskich poziomach estriolu w wodach płodowych. U chłopców, nawet tych ze znacznymi nieprawidłowościami zewnętrznych narządów płciowych stwierdza się prawidłowe poziomy testosteronu i gonadotropin [43]. W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) chorych stwierdza się hipoplazję

http://rcin.org.pl

płatów czołowych, móżdżku i pnia mózgu, a w badaniu histopatologicznym obserwuje się demielinizację mózgu, nerwów czaszkowych i obwodowych oraz zanik komórek nerwowych [13, 14, 25, 27].

W roku 1987 Curry i wsp. [18] wyodrębnili letalny, tzw. typ II zespołu SLO, będący ciężką postacią choroby, w którym obserwowane są ponadto znacznie powiększone nadnercza, przerost komórek wysp Langerhansa trzustki, jednopłatowe płuca, rozszczep podniebienia, uszkodzenie wątroby i zaćma [18].

WYSTĘPOWANIE

Na podstawie dotychczasowych badań częstość występowania zespołu szacuje się na ok. 1:10000–1:60000, a nawet 1:80000–1:100000. Najrzadziej choroba występuje w Holandii (1:80000–1:100000) [Waterham i wsp., dane niepublikowane], w Wielkiej Brytanii i Stanach Zjednoczonych (1:60000) [Kelly i Tint dane niepublikowane, 58] oraz populacjach azjatyckich, afrykańskich i latynoamerykańskich [58]. Niewiele przypadków wykrywa się też w Japonii [64]. Znacznie wyższa częstość występowania zespołu SLO charakteryzuje populację pochodzenia europejskiego (1:20000) [38, 44]. Szczególnie często choroba występuje w Europie Środkowo-Wschodniej, w populacji słowackiej (1:20000) i populacji czeskiej (1:10000) [38]. Obserwacje te wskazują, że współczynnik nosicielstwa uszkodzonego genu w niektórych populacjach europejskich może być bardzo wysoki i wahać się w granicach 1,4–2% [45, 62, 49]. Przeprowadzone ostatnio badania w Ontario (Kanada), identyfikujące zespół SLO w kaukaskiej populacji noworodków oraz płodów (prenatalnie), pozwoliły określić jego częstość na około 1:22000. Z kolei prowadzone na tym samym terenie badania populacyjne nad określeniem częstości heterozygotycznego nosicielstwa choroby (na podstawie najczęściej identyfikowanej w tym regionie mutacji, IVS8-1:g→c) wykazały, że częstość nosicieli może wynosić od 1:21 do 1:58, co sugerowałoby występowanie zespołu z częstością od 1:1700 do 1:13400 [4, 48]. Oznacza to, że zespół SLO, obok mukowiscydozy i fenyloketonurii należy do najczęstszych chorób metabolicznych. Zespół występuje we wszystkich rasach, a rodzice chorego dziecka są zazwyczaj niespokrewnieni. Znaczna zmienność ekspresji objawów (występowanie przypadków o przebiegu umiarkowanym), brak obecności objawów patognomonicznych bądź obligatoryjnie występujących w tym zespole, brak wad zewnętrznych narządów płciowych u dziewczynek dotkniętych tym zespołem czy wreszcie jego pre- i postnatalna letalność (przypadki o niezwykle ciężkim przebiegu) – wszystkie te czynniki utrudniają identyfikację zespołu, w konsekwencji czego jest on rozpoznawany niezmiernie rzadko [40, 41].

ASPEKTY BIOCHEMICZNE I ETIOLOGIA ZESPOŁU SLO

Ze względu na charakter wad, dotyczących zwłaszcza narządów wewnętrznych, od początku podejrzewano, że przyczyną choroby jest blok metaboliczny. Jednak do wczesnych lat dziewięćdziesiątych zespół SLO można było rozpoznać jedynie na podstawie badania przedmiotowego, przeprowadzonego przez doświadczonego i

http://rcin.org.pl

zręcznego dysmorfologa. Nie znano żadnego markera biochemicznego ani genetycznego, na podstawie którego można by zweryfikować rozpoznanie kliniczne [19, 51, 59]. Dopiero wykrycie przez Irons i Tinta w 1993 roku [31, 62] poważnych zaburzeń w biosyntezie cholesterolu u dzieci z zespołem SLO przyczyniło się do radykalnych zmian w diagnostyce choroby. Okazało się, że dzięki oznaczeniu poziomu cholesterolu i 7-dehydrocholesterolu (7DHC) w plazmie krwi za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS) można zweryfikować rozpoznanie kliniczne zespołu oraz wyodrębnić spośród innych chorób metabolicznych, przebiegających z niskim poziomem cholesterolu bez podwyższonego poziomu 7-DHC [35]. Umożliwiło to również weryfikację rozpoznania zespołu SLO postawionego u pacjentów przed rokiem 1993.

Badania Tinta i wsp. [63] wykazały, że przyczyną choroby jest brak lub obniżenie aktywności reduktazy Δ7-dehydrocholesterolu (DHCR7). Enzym ten katalizuje ostatni etap w biosyntezie cholesterolu; powoduje redukcję podwójnego wiązania w pozycji C7-C8 w 7-dehydrocholesterolu i prowadzi do powstania cholesterolu [ryc.1]. U chorych obserwuje się niskie stężenie cholesterolu w osoczu: 8–101 mg/dm^3, podczas gdy wartości prawidłowe wynoszą ok. 150 mg/dm^3. Nagromadza się natomiast jego bezpośredni prekursor, 7-dehydrocholesterol (7DHC), co jest obserwowane w wielu tkankach: surowicy i osoczu, żółci, krwinkach czerwonych i fibroblastach. Poziom 7-DHC w osoczu u osób z zespołem SLO wynosi 12–32 mg/dm^3, przekraczając 1000-krotnie wartości prawidłowe [31, 35, 62]. Poza 7-DHC nagromadza się także jego izomer 8-dehydrocholesterol (8-DHC), wytwarzany z 7-DHC przez sterolową Δ^7–Δ^8 izomerazę. Pomiar stężenia obu izomerów za pomocą metody GC/MS stanowi podstawowy test biochemiczny w procesie diagnozowania choroby. Stwierdzono, że poziom 7-DHC i 8-DHC jest zawsze podwyższony, nawet i u tych nielicznych chorych (ok. 10%), u których poziom cholesterolu jest prawidłowy lub leży w dolnej granicy normy [17].

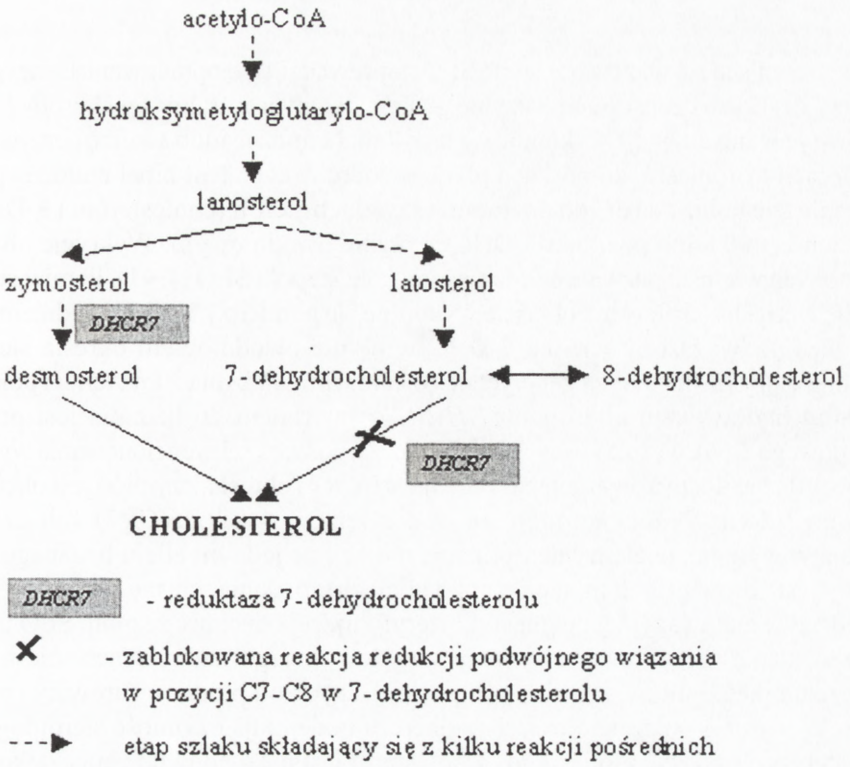
LECZENIE DIETETYCZNE

Wczesne wykrycie zespołu SLO pozwala na szybkie zastosowanie odpowiedniego leczenia dietetycznego. Ukazujące się od 1994 roku doniesienia na temat efektów leczenia pacjentów z zespołem SLO wskazują na pozytywny wpływ diety bogatej w cholesterol na złagodzenie przebiegu choroby [32, 45, 65]. Obserwuje się zarówno poprawę niektórych objawów klinicznych (w zakresie wzrastania oraz ustępowania pewnych objawów neurologicznych), jak i podwyższenie poziomu cholesterolu.

Leczenie polega na zastosowaniu diety bogatej w cholesterol (początkowo 20–40 mg/kg m.c./dobę, następnie do 100 mg/kg m.c./dobę) i podaży kwasów żółciowych.

Celem leczenia jest zahamowanie aktywności reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), katalizującej konwersję HMG-CoA do kwasu mewalonowego. Enzym ten bierze udział w syntezie endogennego cholesterolu. Zahamowanie endogennej syntezy cholesterolu zapobiega gromadzeniu się nieprawidłowych jego prekursorów, w tym 7-DHC. Podobnie działają statyny (nazwa

http://rcin.org.pl



RYCINA 1. Biosynteza cholesterolu

chemiczna: simvastatin, nieczynny farmakologicznie lakton), od niedawna testowane w terapii zespołu SLO. Inhibitorem reduktazy HMG-CoA jest również 7-DHC gromadzący się w błonach mikrosomalnych, który prawdopodobnie (M. Nowaczyk – informacja ustna) może być substratem do produkcji steroli i sterydów.

Obecnie pewne kontrowersje budzi podawanie kwasów żółciowych. Kwasy żółciowe są niezbędne do trawienia i wchłaniania tłuszczów i normalnie są syntetyzowane z cholesterolu. Cholesterol jest także odpowiedzialny za uaktywnienie 7 alfa-hydroksylazy, enzymu inicjującego biosyntezę kwasów żółciowych, w postaci kwasu ursodeoksycholowego (15 mg/kg w dwóch dawkach podzielonych) i chenodeoksycholowego; ten ostatni jest inhibitorem reduktazy HMG-CoA. Nie do końca wiadomo, czy kwasy żółciowe podawane równocześnie z dietą bogatocholesterolową wywierają pozytywny wpływ na przebieg choroby i który z nich (kwas ursodeoksycholowy czy chenodeoksycholowy) działa korzystniej. Zaobserwowano np. gwałtowny wzrost poziomu cholesterolu w surowicy krwi u pacjentów leczonych kwasami żółciowymi, co prawdopodobnie świadczy o upośledzonym tkankowym wchłanianiu cholesterolu, gdyż kwasy żółciowe obniżają aktywność receptorów lipoprotein LDL.

http://rcin.org.pl

DIAGNOSTYKA PRZEDURODZENIOWA

Rozszerzająca się wiedza o zespole SLO doprowadziła do opracowania wiarygodnej -inwazyjnej (klasycznej) i nieinwazyjnej – diagnostyki prenatalnej tej choroby [42]. W diagnostyce "inwazyjnej" wykonuje się testy biochemiczne i/lub analizę genetyczną w komórkach trofoblastu, komórkach płynu owodniowego. Test biochemiczny polega na ocenie stosunku 7-DHC do poziomu wszystkich steroli (cholesterolu i 8-DHC) w tkankach zarodka lub poziomu 7-DHC w płynie owodniowym. Wykrycie obu podwyższonych wartości pozwala na zdiagnozowanie zespołu SLO [1, 41]. Pomiar stężenia 7-DHC i innych steroli w trofoblaście wykonuje się pomiędzy 11–12 tygodniem ciąży, natomiast podwyższony poziom 7-DHC w płynie owodniowym określa się w 13 tygodniu ciąży [50]. Analiza genetyczna została wprowadzona 2 lata temu i polega na zbadaniu budowy obu alleli genu *DHCR7.* Materiałem do badania jest preparat genomowego DNA wyizolowany z trofoblastu. Za pomocą sekwencjonowania wykrywa się specyficzne dla rodziny mutacje w genie *DHCR7* i określa, czy płód jest obciążony chorobą (identyfikacja mutacji na obu allelach genu *DHCR7)* lub czy jest bezobjawowym nosicielem (identyfikacja mutacji na jednym allelu badanego genu) lub czy jest zdrowy (brak mutacji na obu allelach) [badania własne, 11].

Podstawą nieinwazyjnej diagnostyki weryfikującej obecność zespołu SLO u płodu jest wykazanie zaburzonej biosyntezy sterydów w jego nadnerczach, m.in. przez oznaczenie metabolitów sterydowych pochodzących od płodu w surowicy (moczu) matki. W warunkach prawidłowych nadnercza podejmują czynność steroidogenezy około 8 tygodnia życia płodowego. Cholesterol jest niezbędny do zapoczątkowania biosyntezy hormonu sterydowego, którym jest estriol (E_3). Defekt syntezy cholesterolu uniemożliwia powstanie w nadnerczach płodu następnego prekursora estriolu, którym jest dehydroepiandrosteron. Pochodne estriolu (siarczan 16α-hydroksy-dehydroepiandrosteronu) są przekształcane przez enzymy łożyskowe do E_3, który przedostaje się do krążenia matczynego. Obniżony poziom wolnego E_3 w surowicy matki, badany w II trymestrze ciąży np. za pomocą testu potrójnego może być jednym z markerów obecności zespołu SLO u płodu. Test potrójny jest testem przesiewowym w kierunku aberracji chromosomowych i otwartych wad cewy nerwowej. W diagnostyce prenatalnej zespołu SLO nie może być wykorzystywany jako podstawowy test diagnostyczny, gdyż obniżony poziom E_3 stwierdza się w wielu różnych zaburzeniach genetycznych, np. deficycie sulfatazy sterolowej oraz aberracjach chromosomowych.

Ostatnio zaproponowano bezinwazyjne badanie prenatalne przez identyfikację nietypowych metabolitów steroidogenezy płodowej pod postacią 7- i 8-dehydroestrioli (od 12 tygodnia ciąży) w moczu kobiety noszącej płód z zespołem SLO [7, 60]. Są to estriole typu ekwininy, występującej w moczu klaczy. Oba te metabolity są potencjalnymi kandydatami do pełnienia roli markerów zespołu SLO u płodów. Oczekuje się, że w przyszłości omawiana diagnostyka może odgrywać rolę badania przesiewowego w kierunku zespołu SLO.

http://rcin.org.pl

Należy wspomnieć, że obecność zespołu SLO u płodu można wykryć za pomocą badania ultrasonograficznego. Obserwacja w 13–14 tygodniu ciąży objawu "przeświecającego obrzęku karku u płodu" (ang. *nuchal translucency*) spowodowanego zgrubieniem przestrzeni między skórą a tkankami miękkimi bądź zespołu mnogich wad wrodzonych pod postacią m.in. holoprosencefalii, obojnaczych zewnętrznych narządów płciowych, wady serca, rozszczepu podniebienia oraz polidaktylii dłoni/stóp wskazuje na duże prawdopodobieństwo występowania zespołu SLO.

ROLA CHOLESTEROLU W EMBRIOGENEZIE

Cholesterol jest metabolitem niezbędnym dla prawidłowego rozwoju każdego organizmu eukariotycznego. Jest on głównym składnikiem mieliny i błon komórkowych oraz podstawowym substratem w biosyntezie sterydów i steroli, takich jak: kwasy żółciowe, hormony płciowe, kortykosterydy i witamina D_3. Ostatnio pojawiają się doniesienia o szczególnie znaczącej roli cholesterolu w embrionalnym rozwoju zwierząt [24, 30].

Cholesterol może być pozyskiwany przez komórki w wyniku endogennej biosyntezy lub transportu z udziałem receptorów [8, 27]. Nie wiadomo dotychczas, czy zarodki we wczesnym stadium rozwoju pozyskują cholesterol za pomocą endogennej biosyntezy, czy korzystają jedynie z chole-sterolu zgromadzonego przez matkę. Wykazano natomiast, że w późniejszym okresie embriony są już zdolne do samodzielnego syntetyzowania większej ilości potrzebnego im cholesterolu [5, 34].

Blok w biosyntezie cholesterolu w okresie embriogenezy powoduje z jednej strony niedobór tego związku, a z drugiej strony nadmierne gromadzenie się metabolitów z przemian steroli we wszystkich błonach komórkowych, co w konsekwencji powoduje nieprawidłowości w rozwoju wielu narządów i tkanek. Brak cholesterolu może być wywołany nie tylko deficytem enzymów biorących udział w jego biosyntezie, lecz także nieprawidłowościami w budowie apolipoprotein lub receptorów komórkowych, które współdziałają w transporcie cholesterolu od matki do zarodka [24].

Większość cholesterolu występuje w osoczu w postaci zestryfikowanej. Hydrofobowy charakter tego związku wymusza jego transportowanie w specjalnie uformowanych małych drobinach o średnicach 10–100 nm zwanych lipoproteinami. Białka wchodzące w skład lipoprotein nazwano apolipoproteinami. Cholesterol jest transportowany w lipoproteinach osocza, a największa jego ilość znajduje się w LDL (β-lipoproteinach).

Rola apolipoprotein w rozwoju embrionalnym została lepiej zbadana na modelu mysim. Myszy z wyindukowanymi mutacjami w genie kodującym apoB wykazywały wady rozwojowe ośrodkowego układu nerwowego. U większości homozygotycznych organizmów całkowity niedobór apoB, wywoływał śmierć zarodka między 8 a 9 dniem embriogenezy [22]. Letalność embrionów była wywołana zaburzeniami w transporcie substancji odżywczych (np. cholesterolu, witaminy E) od matki do zarodka, wynikającymi z nieprawidłowości w powstawaniu i funkcjonowaniu apoB w ciałku żółtym endodermy [23]. Zastosowanie inhibitora biosyntezy cholesterolu u zarodka

http://rcin.org.pl

myszy posiadającego mutację w genie apoB spowodowało pojawienie się jeszcze cięższych zaburzeń rozwojowych [43, 44]. Przeprowadzone badania wykazały, że egzogenny transport cholesterolu (za pomocą apolipoprotein) pokrywa tylko częściowe zapotrzebowanie zarodka na cholesterol. Reszta cholesterolu jest dostarczana w drodze endogennej biosyntezy [24].

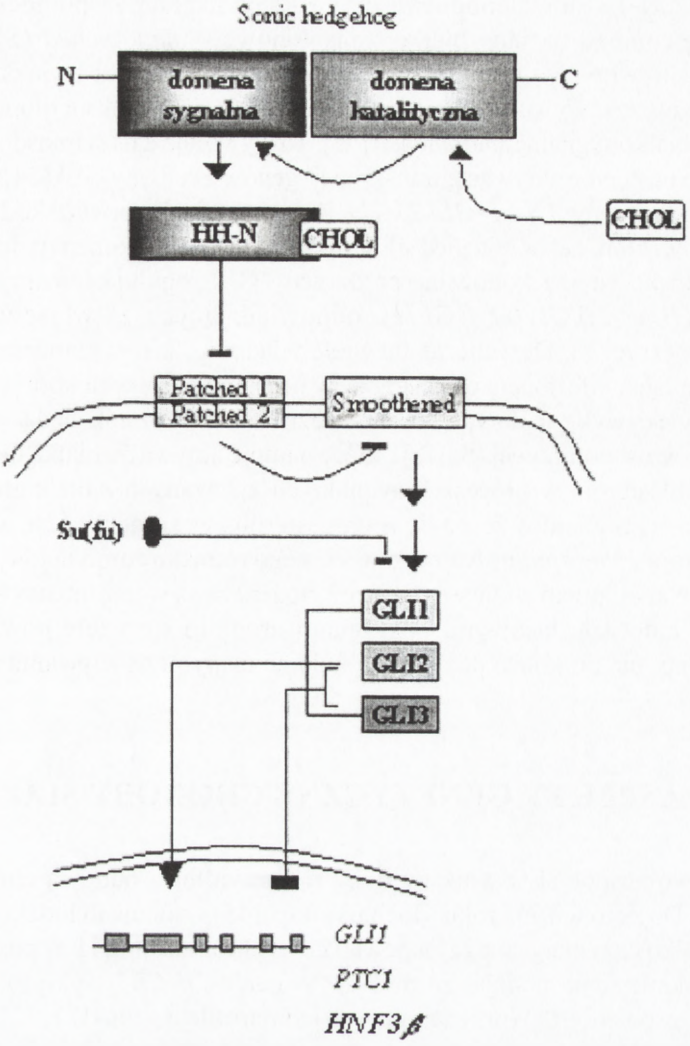
Ogromną rolę w prawidłowym rozwoju zarodka odgrywają również receptory komórkowe, które wiążą apolipoproteiny i biorą udział w embrionalnym transporcie lipidów. Większość zidentyfikowanych dotychczas receptorów należy do rodziny receptorów LDL (ang. *low density lipoproteins*) [24]. Liczba receptorów LDL na powierzchni komórki jest regulowana zgodnie z zapotrzebowaniem komórki na cholesterol. Napływ cholesterolu do komórki zmniejsza liczbę receptorów LDL, co wynika ze zjawiska sprzężenia zwrotnego ujemnego (ang. *down regulation*).

Na podstawie danych eksperymentalnych opracowano mysi model transportu lipidów i substancji odżywczych rozpuszczalnych w tłuszczach pomiędzy matką a zarodkiem. Model ten zakłada, że w ciałku żółtym istnieje białko, tzw. mikrosomalne białko transportujące trójglicerydy – MTP (ang. *microsomal trigliceride transfer protein*), odgrywające kluczową rolę w syntetyzowaniu i "składaniu" lipoprotein zawierających apoB. Białko to jest niezbędne do pobierania lipidowych substancji odżywczych przez rozwijający się zarodek [23, 69].

Embriogeneza jest regulowana przez szereg złożonych procesów sygnalnych, których funkcjonowanie jest konieczne dla prawidłowego rozwoju organizmu. Jedna z takich dróg sygnalnych, oznaczona SHH-PTCH-GLI, rozpoczyna się udziałem białek zwanych *sonic hedgehog* (ang. *sonic* – sygnalny; *hedgehog* – jeż, ponieważ mutacje w obrębie kodującego to białko genu powodują, że larwy muszek nie rozwijają się prawidłowo – są zwinięte w kłębek i najeżone, przypominając przestraszone jeże). Białka *hedgehog* w komórkach docelowych zapoczątkowują kaskadę reakcji, prowadzących do aktywacji lub represji genów polarności za pomocą czynników transkrypcyjnych z rodziny GLI [33, 54, 55, 56]. Schemat drogi przekazywania sygnałów regulujących embriogenezę przedstawiono na rycinie 2. Budowa białek szlaku SHH-PTCH-GLI jest silnie konserwowana, co wskazuje na ich kluczową rolę w procesach rozwojowych. Interesujący jest fakt, że defekty powstałe na różnych etapach tego szlaku prowadzą do podobnych objawów klinicznych. Najpewniej związane jest to z faktem, że ostatecznie cała kaskada reakcji jest odpowiedzialna za regulację ekspresji genów polarności, kodujących białka rozwojowe organizmu [73].

Ten uniwersalny dla wielu chorób fenotyp obserwuje się również u pacjentów z zespołem SLO. Na tej podstawie przypuszczano, że choroba ma ścisły związek z procesami sygnalnymi [21, 36, 63]. W ciągu ostatnich kilku lat ukazała się duża ilość informacji o mechanizmie działania i znaczeniu tych procesów [12, 54, 55, 61]. W 2000 roku, po wykryciu kluczowej roli cholesterolu w procesach transdukcji sygnału, udało się potwierdzić przypuszczenia o związku zespołu SLO ze szlakiem SHH-PTCH-GLI [29, 46, 52, 57, 70, 73]. Ustalono, że co najmniej dwa białka: białko sygnalne mysie (*murine sonic hedgehog*, SHH) i muszki owocowej (*Drosophila hedgehog*, HH) ulegają proteolitycznym przemianom, łącząc się kowalencyjnie N-fragmentem z

http://rcin.org.pl



RYCINA 2. Model oddziaływania białek *hedgehog* w procesie transdukcji sygnału: Su(fu) – supresor kinazy serynowo-treoninowej, CHOL – cholesterol, HH-N – domena sygnalna białka SHH, GLI – geny z rodziny GLI: *GLI 1, PTCI, HNF3β* – geny polarności

podjednostką cholesterolu [54]. Modyfikacja białka SHH za pomocą cholesterolu jest konieczna do wymuszenia transdukcji sygnału. Po przyłączeniu się cholesterolu (CHOL) do cząsteczki białka sygnalnego następuje dysocjacja tego białka. Zaktywowana wówczas N-końcowa domena białka (SHH-N) może zlokalizować kompleks błonowych białek *patched-smoothened* (tzn. łaciate i wygładzone, ponieważ mutacje w obrębie genów kodujących te białka powodują, że myszy mutanty mają łaciatą lub wygładzoną sierść) i połączyć się z nim [52, 55, 70]. Białka z rodziny *patched: patched-1* (PTCH-1) i *patched-2* (PTCH-2) to receptory umieszczone w błonie komórek docelowych.

http://rcin.org.pl

Receptor PTCH-1 i prawdopodobnie PTCH-2 oddziałują za pomocą sprzężenia zwrotnego ujemnego na inne białko transbłonowe – *smoothened* (SMOH) [61]. Powstanie zaktywowanej przez cholesterol domeny SHH-N i związanie się jej z receptorem *patched* wywołuje zmiany strukturalne w kompleksie błonowym, które uaktywniają białko sygnalne *smoothened* [55]. To wywołuje dalszą transdukcję sygnału w komórce, a następnie aktywację transkrypcji genów z rodziny GLI [24]. W skład tej grupy wchodzą 4 geny: *GLI 1, GLI 2, GLI 3 i GLI 4*. Trzy pierwsze kodują czynniki transkrypcyjne, które zawierają pięć silnie konserwowanych domen (palce cynkowe). Czynniki transkrypcyjne kodowane przez geny GLI regulują transkrypcję genów polarności (*HNF-3β, PTC1 i GLI1*), odpowiadających za właściwy przebieg embriogenezy (ryc. 2). Dotychczas niewiele wiadomo, jak w komórkach ludzkich przekazywana jest informacja od receptorów powierzchniowych komórek do białek GLI. U człowieka wykryto dotychczas cytoplazmatyczny czynnik, będący supresorem kinazy serynowo-treoninowej (Su[fu]), który hamuje aktywację białka GLI 1[61, 73].

Udział cholesterolu w procesach sygnalnych związanych z białkami *hedgehog*, utwierdza w przekonaniu, że poziom cholesterolu w komórce jest wskaźnikiem kontrolnym (ang. *checkpoint*) w czasie wczesnego rozwoju zarodka [54]. Zależności pomiędzy metabolizmem cholesterolu a embriogenezą są wciąż intensywnie badane. W związku z dotychczasowymi odkryciami zrodziło się wiele nowych pytań i niejasności, np. nie do końca poznane są kolejne etapy przekazywania sygnałów w komórce [24].

ASPEKTY GENETYCZNE CHOROBY SLO

Początkowo zespół SLO wiązany był z nieprawidłową budową chromosomu 7 (7q32.1) [2]. Dopiero w 1998 roku Moebius i wsp. [45] sklonowali ludzki gen *DHCR7* kodujący białko enzymatyczne i zmapowali go na chromosomie 11 w pozycji q12-13. Najnowsze doniesienia podają, że mutacje w genie *DHCR7* wykryto aż u 96,6% pacjentów z zespołem SLO (przynajmniej na jednym allelu genu) [71, 72]. Nie można jednak wykluczyć udziału innego genu w patogenezie tego zespołu [66]. Nadal pozostaje do wyjaśnienia, czy redukcja aktywności reduktazy 7-dehydrocholesterolu jest wynikiem mutacji jedynie w genie kodującym białko enzymatyczne, czy może także w genie kodującym białko będące regulatorem ekspresji i aktywności enzymu. Mógłby to być defekt kofaktora lub transportera niezbędnego do prawidłowej funkcji enzymu [66]. Jest to prawdopodobne, ponieważ istnieją doniesienia o pacjentach z fenotypem zespołu SLO, u których udało się zidentyfikować tylko po jednej mutacji (8%) w genie *DHCR7* [badania własne, 20, 68, 70, 72, 74].

Ekspresja genu u osób dorosłych zachodzi w wątrobie, nadnerczach, mózgu i jelicie cienkim. Gen obejmuje obszar około 14 kpz i składa się z dziewięciu eksonów. Dwa pierwsze eksony nie ulegają translacji. Kodon starterowy znajduje się w obrębie eksonu 3. Powstałe w wyniku translacji białko składa się z 475 aminokwasów, a jego masa wynosi 54,5 kDa [45]. Składa się z 9 transmembranowych domen, od których odchodzi

http://rcin.org.pl

fragment N-końcowy skierowany do cytozolu i fragment C-końcowy ulokowany w retikulum endoplazmatycznym (ER). Fragmenty domen umieszczone w błonie (TM) to regiony najbardziej konserwowane i w ich obrębie usytuowanych jest większość poznanych mutacji. Ponadto wiele mutacji wykryto w ostatniej pętli cytoplazmatycznej (4L) i C-końcowej części białka umieszczonej w retikulum (CT). Czwarta pętla cytozolowa jest również silnie konserwowana, gdyż jest to obszar z centrum aktywnym i miejscem wiązania kofaktora enzymu – NADPH [26, 31] (ryc. 3).

Do tej pory opisano 93 różne mutacje i 12 zmian polimorficznych w *locus* genu *DHCR7* [20, 66, 67, 71, 72, 74] (ryc. 3).

Największą grupę mutacji stanowią podstawienia nukleotydowe (łącznie 90%), wśród których dominują mutacje zmieniające informację kodonu (ang. *missense mutation*) – 0,93 oraz występują mutacje zaburzające prawidłowe składanie genu (ang. *splice-site mutation*) – 0,02 i mutacje wprowadzające kodon terminacyjny (ang. *stop codon mutation*) – 0,05. Bardzo rzadko występują mutacje typu delecji i insercji (10%).

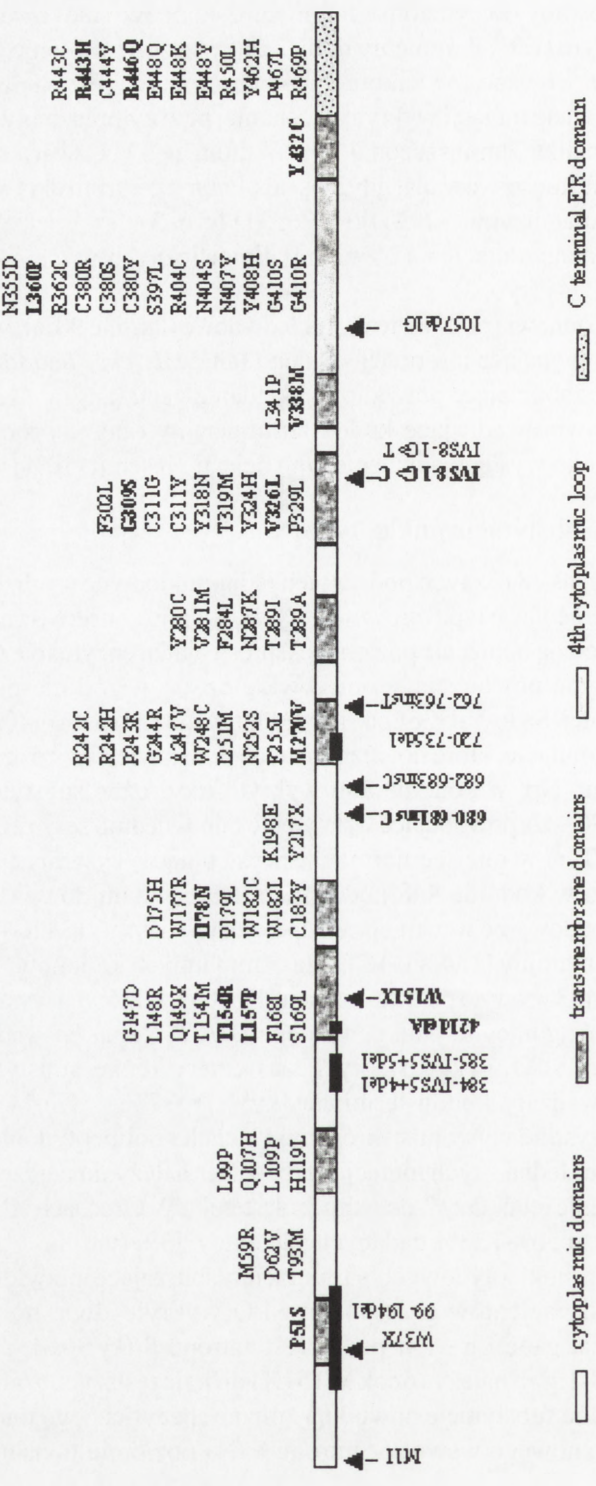
Substytucje nukleotydowe

Zidentyfikowano dotychczas 78 różnych podstawień jednonukleotydowych, które zmieniają informację kodonu. Mutacje typu *missense* dotyczące silnie konserwowanych reszt aminokwasowych powodują obniżenie poziomu ekspresji białka enzymatycznego [26]. Cztery mutacje tego typu powtarzają się niezwykle często wśród niespokrewnionych pacjentów rasy białej. Są to Val326Leu, Thr93Met, Arg352Trp i Arg404Cys [tab. 1]. Występują również mutacje, które dotyczą różnych podstawień i/lub różnych pozycji tego samego kodonu. Np. w kodonie 380 wykryto trzy różne substytucje: 1138T→A, 1138T→C i 1139G→A powodujące wstawienie odpowiednio seryny (Ser), argininy (Arg), i tyrozyny (Tyr) w miejsce normalnie występującej cysteiny (Cys). Podobnie, trzy podstawienia w kodonie 448 kodującym kwas glutaminowy (Glu), powodują nieprawidłowe wbudowanie w to miejsce odpowiednio lizyny (1342G→A), tyrozyny (1342G→T) lub glutaminy (1342G→C). Dla ośmiu innych kodonów: 154, 182, 242, 311, 352, 404, 410 i 443 wykryto po dwie mutacje. Kodony, w których wystąpiło kilka mutacji, można nazwać „gorącymi punktami" genu *DHCR7* (ang. *hot-spots*).

U pacjentów z zespołem SLO wykryto dotychczas cztery różne substytucje nukleotydowe, które wprowadzały kodon terminacyjny: Trp37Ter, Gln149Ter, Trp151Ter i Tyr217Ter. Wszystkie wywołują skrócenie łańcucha polipeptydowego i całkowitą inaktywację białka. Jedna z tych mutacji, Trp151Ter należy do najczęściej identyfikowanych zmian w genie reduktazy 7-dehydrocholesterolu. W Czechach i Polsce występuje ona odpowiednio, u 50% i 33% badanych pacjentów [39] (tab. 1).

Trzecią grupą podstawień nukleotydowych są mutacje zaburzające prawidłowe wycinanie intronów. Wśród pacjentów z zespołem SLO wykryto dwie mutacje splicingowe. Jest to tranzycja g→c i g→t w pozycji –1 intronu 8 (IVS 8-1:g→c i IVS8-1:g→t). Mutacja IVS8-1:g>c należy (obok W151X) do najczęstszych zmian w genie *DHCR7*. Obie omawiane substytucje powodują zmianę specyficznego miejsca akceptorowego i utworzenie nowego wewnątrz intronu 8. Na poziomie transkryptu

http://rcin.org.pl



RYCINA 3. Rozmieszczenie mutacji w genie *DHCR7* u pacjentów z zespołem Smithsa, Lemlego i Opitza (pogrubioną czcionką zaznaczono mutacje zidentyfikowane w populacji polskiej)

http://rcin.org.pl

TABELA 1. Mutacje powtarzalne w genie *DHCR7* i ich częstość występowania (w %) w różnych populacjach pacjentów z zespołem SLO

	Polska	Czechy	Austria/Niemcy	Anglia	USA/Szwecja
IVS8-1:g>c	3	5	20	34	34
W151X	33	50	18	2	–
V326L	23	27,8	18	0	7,8
T93M	0	–	0	7	12,5
R352W	13	–	7	0	–
R404C	0	–	2	9	–

obserwuje się wbudowanie między sekwencją eksonu 8 i 9 dodatkowych 134 par zasad pochodzących z intronu 8. Zmutowany transkrypt ma zmienioną ramkę odczytu, co prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji.

Insercje i delecje

Dotychczas wykryto sześć różnych delecji i trzy insercje w genie *DHCR7* u pacjentów z zespołem SLO. Większość tych mutacji jest specyficzna dla danej rodziny, w związku z czym identyfikowane są jako pojedyncze przypadki. Cztery z nich obejmują większe fragmenty genu (od kilku do kilkudziesięciu par zasad), a dwie pozostałe jedynie pojedyncze nukleotydy. W eksonie 5 znajdują się punkty początkowe dwu podobnych do siebie delecji, o takiej samej długości 33 par zasad, które obejmują fragment eksonu 5 i przylegającą sekwencję donorową w intronie 5. Jedna delecja rozciąga się od nukleotydu w pozycji 384 do nukleotydu w pozycji 412 + 4 (384-IVS5+4 del). Druga jest przesunięta w stosunku do pierwszej o jeden nukleotyd dalej. W wyniku obu tych delecji zostaje usunięta specyficzna sekwencja donorowego miejsca wycinania intronu 5. Dotychczas nie wyjaśniono wpływu delecji 384-IVS5+4 na składanie genu; stwierdzono jedynie, że powstający transkrypt jest bardzo niestabilny [20]. Podobnie jest w przypadku drugiej mutacji. Wszystkie wykryte insercje usytuowane są w eksonie 7: insercja nukleotydu cytydynowego (C) w pozycji 680 i 682 oraz insercja nukleotydu tymidynowego (T) w pozycji 762. Wstawienie dodatkowych nukleotydów, podobnie jak delecje fragmentu genu powodowały znaczne zaburzenia w budowie tworzonego łańcucha polipeptydowego.

Mutacje powtarzalne i ich częstość występowania w różnych populacjach

Dotychczasowe badania prowadzone w populacji brytyjskiej, austriacko-niemieckiej, polskiej, czeskiej i szwedzkiej [39, 72, 74], wykazały, że spośród 93 różnych mutacji w największej liczbie rodzin występuje sześć następujących zmian: IVS8-1:g→c (21%), W151X (16%), V326L (14%), R352W, R404C (9%), T93M (6,8%). Interesujący jest fakt, że każda z badanych populacji pacjentów charakteryzuje się obecnością jednej, dwu lub trzech najczęściej powtarzających się mutacji (tab. 1).

http://rcin.org.pl

W grupach polskiej i czeskiej dwie mutacje Trp151Ter i Val326Leu, stanowią dominujące uszkodzenia genu *DHCR7*. W populacji polskiej występują one odpowiednio, na 33 i 23% przebadanych alleli, a w populacji czeskiej, odpowiednio, na 50 i 28% wszystkich przebadanych alleli genu *DHCR7* [39, 67].

Odmienne wyniki charakteryzują północno-zachodnią Europę. W grupie brytyjskiej i szwedzkiej najczęściej powtarzającym się uszkodzeniem genu jest mutacja IVS8-1:g→c, która występuje z częstością 34%. Następne pod względem częstości występowania są mutacje: T93M w Szwecji (12,5%) i R404C w Anglii (9%) [53, 54]. Podobnie w Europie Centralnej (Austria i Niemcy) mutacja IVS8-1:g→c jest najczęstszą zmianą w genie *DHCR7*, jednak występuje z mniejszą częstością, sięgającą 20%. Na kolejnych pozycjach lokują się mutacje W151X i V326L, obie z częstością 18% [72].

Analiza częstości występowania poszczególnych mutacji w różnych populacjach ujawniła istnienie gradientu Wschód-Zachód, sugerując, że poszczególne zmiany w genie *DHCR7* powstały w różnych krajach, a następnie zostały odziedziczone i rozprzestrzenione w danym regionie. Typy mutacji w populacji polskiej i czeskiej zasadniczo różniły się od rodzajów mutacji w populacji brytyjskiej i szwedzkiej. Natomiast kraje z Europy Centralnej miały rozkład rodzajów mutacji pośredni pomiędzy krajami z Europy Wschodniej i Zachodniej [72].

Korelacja genotyp-fenotyp

W zespole Smitha, Lemlego i Opitza obserwuje się dużą różnorodność objawów zarówno klinicznych, jak i biochemicznych, co próbuje się wiązać z szerokim spektrum mutacji w genie *DHCR7* i z poziomem aktywności enzymu zależnym od rodzaju mutacji. Chore dzieci z ciąży bliźniaczej, o tym samym defekcie w genie *DHCR7*, wykazywały identyczne objawy choroby [26, 39, 74], podczas gdy niespokrewnieni ze sobą pacjenci posiadający takie same mutacje mogą prezentować zupełnie inny obraz kliniczny. Fakt ten, obserwowany wielokrotnie, wskazuje, że na fenotyp choroby może mieć wpływ nie tylko rodzaj mutacji w genie *DHCR7*, lecz także dodatkowe czynniki modyfikujące ekspresję genu lub nawet inne geny bądź czynniki regulujące proces biosyntezy cholesterolu.

Badanie korelacji między genotypem a fenotypem jest utrudnione ze względu na nieliczną dotychczas w pełni zdiagnozowaną grupę pacjentów (ok. 200), z których większość to złożone heterozygoty. Z doniesień literaturowych wynika, że postać łagodna zespołu (typ I zespołu SLO) jest wywoływana przez mutacje, które nieznacznie obniżają aktywność enzymu i są zlokalizowane w domenach transbłonowych (TM) i C-końcowej części białka (CT). Ze względu na położenie mutacji chorzy mogą być homozygotami typu TM/TM lub CT/CT albo heterozygotami TM/CT. Mutacje zmieniające ramkę odczytu lub powodujące przedwczesną terminację translacji, które całkowicie znoszą aktywność genu (0) oraz mutacje zlokalizowane w czwartej pętli cytozolowej (4L) są związane z najbardziej różnorodnym i najcięższym fenotypem choroby (typ II zespołu SLO) [66]. Stąd homozygoty o fenotypie 0/0 i 4L/4L charakteryzują się najcięższymi objawami choroby. Łagodniejsze nieco objawy

http://rcin.org.pl

towarzyszą następującym kombinacjom mutacji: 0/TM, 0/4L, 0/CT, w wyniku których u pacjentów zaobserwowano jedynie mniej lub bardziej obniżony poziom aktywności reduktazy 7-DHC [49, 71].

Zmiany polimorficzne w genie DHCR7

Substytucja nukleotydu w trzeciej pozycji tripletu nie powoduje zazwyczaj zmiany informacji kodonu. Mutacja taka (ang. *silent mutation*) nie powoduje podstawienia niespecyficznego aminokwasu, nie ma znaczenia dla prawidłowego funkcjonowania białka i określana jest jako polimorfizm. W genie *DHCR7* znanych jest 12 zmian polimorficznych, z których większość (10) nie powoduje zmiany rodzaju aminokwasu, np. tranzycja A→G w pozycjach 189 (Glu63Glu) i 285 (Lys95Lys) czy transwersja C→T w pozycjach 207 (Thr69Thr), 231 (Thr77Thr), 438 (Asn146Asn) i 1158 (Asp386Asp). Znane są jednak dwie substytucje, które są odpowiedzialne za zmianę kodowanego aminokwasu: 199G→A (Ala67Thr) i 438 C→T (Asn146Thr). Zostały one uznane także za zmiany polimorficzne, gdyż wykryto je zarówno w grupie osób chorych, jak i w grupie osób kontrolnych.

LITERATURA

[1] ABUELO DN, TINT GS, KELLY R i in. Prenathal diagnosis of the cholesterol biosynthetic defect in the Smith-Lemli-Opitz syndrome by the analysis of amniotic fluid sterol. *Am J Med Genet* 1995; **56**: 281–285.

[2] ALLEY TL, SCHERER SW, HUIZENGA JJ i in. Physical mapping of the chromosome 7 breakpoint region in an SLOS patient with t(7;20)(q32.1;q13.2). *Am J Med Genet* 1997; **68**: 279–281.

[3] ANDERSON AJ, STEPHAN MJ, WALKER WO i in. Variant RSH/Smith-Lemli-Opitz Syndrome with atypical sterol metabolism. *Am J Med Genet* 1998; **78**: 413–418.

[4] BATTAILE KP, BATTAILE BC, MERKENS LS i in. Carrier frequency of the common mutation IVS8-1G>C in DHCR7 and estimate of the expected incidence of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab* 2001; **72**: 67–71.

[5] BELKNAP WM, DIETSCHY JM. Sterol synthesis and low density lipoprotein clearance *in vivo* in the pregnant rat, placenta, and fetus. Sources for tissue cholesterol during fetal development. *J Clin Invest* 1988; **82**(6): 2077–2085.

[6] BLAIR HR, MARTIN JK. A syndrome characterized by mental retardation, short stature, craniofacial dysplasia, and genital anomalies occurring in siblings. *J Pediatr* 1966; **69**: 457–459.

[7] BRADLEY LA, PALOMAKI GE, KNIGHT GJ i in. Levels of unconjugated estriol and other maternal serum markers in pregnancies with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 1999; **82**: 355–358.

[8] BROWN M, GOLDSTEIN JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; **4** (232): 34–47.

[9] BUNDEY S, SMYTH H G. Three sisters with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Ment Defic Res* 1974; **18**: 51–61.

[10] BZDUCH V, BEHULOVA D, SKODOVA J: Incidence of Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome in Slovakia. *Am J Med Genet* 2000; **90**: 260.

[11] BZDUCH V, KOZAK L, FRANKOVA H, BEHULOVA D. Prenathal diagnosis of the Smith-Lemli-Opitz syndrome by mutation analysis. *J Inher Metab Dis* 2000; **23**: 199.

[12] CHIANG C, LITINGTUNG Y, LEE E i in. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; **383**: 407–413.

[13] CHERSTVOY ED, LAZJUK GI, NEDZVED MK i in. The pathological anatomy of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet* 1975; **7**: 382–387.

http://rcin.org.pl

[14] CHERSTVOY ED, LAZJUK GI, OSTROVSKAJA TI i in. The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Virchows Arch-A Pathol Anat* 1984; **404:** 413–425.
[15] CLAYTON PT. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child* 1998; **78**: 185–189.
[16] COTLIER E, RICE P. Cataracts in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Ophthamol* 1971; **71**: 955–959.
[17] CUNNIFF C, KRATZ LE, MOSER A i in. Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism. *Am J Med Genet* 1997; **68**L: 263–269.
[18] CURRY CJR, CAREY JC, HOLLAND JS i in. Smith-Lemli-Opitz syndrome-type II. Multiple congenital anomalies with male pseudohermaphroditism and frequent early lethality. *Am J Med Genet* 1987; **26**: 45–57.
[19] DALLAIRE L. Syndrome of retardation with urogenital and skeletal anomalies (Smith-Lemli-Opitz syndrome). Clinical features and mode inheritance. *J Med Genet* 1969; **6:** 113–120.
[20] DE BRASI D, ESPOSITO T, ROSSI M i in. Smith Lemli Opitz syndrome: evidence of T93M as a common mutation of Δ7-sterol reductase in Italy and report of three novel mutations. *Eu J Hum Gen* 1999; **7**: 937–940.
[21] DONNAI D, BURN J, HUGHES H. Smith-Lemli-Opitz syndromes: do they include the Pallister-Hall syndrome? *Am J Med Genet* 1987; **28**: 741–743.
[22] FARESE RVJR, RULAND SL, FLYNN LM i in. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induce hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **2892**(5): 1774–1778.
[23] FARESE RVJR, CASES S, RULAND SL i in. A novel function for apolipoprotein B: lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice. *J Lipid Res* 1996; **37**(2): 347–360.
[24] FARESE RVJR, HERZ J. Cholesterol metabolism and embriogenesis. *Trends Genet* 1998; **14**(3): 115–120.
[25] FIERRO M, MARTINEZ AJ, HARBISON JW i in. Smith-Lemli-Opitz syndrome. Neuropathologoical and ophtalmological observations. *Dev Med Child Neurol* 1977; **19**: 57–62.
[26] FITZKY BU, WITCH-BAUMGARTNER M, ERDEL M i in. Mutations in the Δ7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8181–8188.
[27] GLASS C, PITTMAN RC, WEINSTEIN DB i in. Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**(17): 5435–5439.
[28] GRACIA CA i in.:Neurological involvement in Smith-Lemli-Opitz syndrome: clinical and neuropathological findings. *Dev Med Child Neurol* 1973; **15**: 46–55.
[29] HAMMERSCHMIDT M, BROOK A, MCMAHON AP. The world according to hedgehog. *Trends Genet* 1997; **13**: 14–21.
[30] HERZ J, WILLNOW TE, FARESE RV. Cholesterol, hedgehog and embriogenesis. *Nat Genet* 1997; **15**: 123–124.
[31] IRONS M. ELIAS ER, SALEN G i in. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet* 1993; **341**: 1414.
[32] IRONS M, ELIAS ER, TINT GS. Abnormal cholesterol metabolism in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: report of clinical and biochemical findings in four patients and treatment in one patient. *Am J Med Genet* 1994; **1** (50): 347–352.
[33] JOHNSON VP. Smith-Lemli-Opitz syndrome. Review and report of two affected sibilings. *Z Kinderheilk* 1975; **119**: 221–234.
[34] JUREVICS HA, KIDWAI FZ, MORELL P. Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs. *J Lipid Res* 1997; **38**(4): 723–733.
[35] KELLY RI. Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts. *Clin Chim Acta* 1995; **236**: 45–58.
[36] KELLEY RI, ROESSLER E, HENNEKAM RC i in. Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of sonic hedgehog? *Am J Med Genet* 1996; **66**: 478–484.
[37] KELLY RI. Smith-Lemli-Opitz Syndrome. (poczta elektroniczna)
[38] KELLY RI. Editorial. A new face for an old syndrome. *Am J Med Genet* 1997: **68**: 252–256.
[39] KOZAK L, FRANKOVA H, HRABINCOVA E i in. Characterization of DHCR7 mutant alleles in 9 Smith Lemli Opitz familes. *J Inher Met Dis* 1999; **22**:suppl.1.
[40] KRAJEWSKA-WALASEK M. Zespół Smitha, Lemlego i Opitza w praktyce klinicznej. *Post Pediatr* 1996: 873–880.

http://rcin.org.pl

[41] KRAJEWSKA-WALASEK M, GRADOWSKA W, RYŻKO J i in. Further delineation of the classical Smith-Lemli-Opitz syndrome phenotype at different patient ages: clinical and biochemical studies. *Clin Dysmorphol* 1999; **8**(1): 29–40.
[42] KRATZ L, KELLY R I. Prenathal diagnosis of the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 1999; **82**: 376–381.
[43] LANOUE L, DEHART DB, HINSDALE ME i in.: Limb, genital, CNS and facial malformations result from gene/environment-induced cholesterol deficiency: further evidence for a link to sonic hedgehog. *Am J Med Genet* 1997; **73**: 24–31.
[44] LOWRY RB, YOUNG SL. Borderline normal intelligence in the Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome. *Am J Med Genet* 1980; **5:** 137–143.
[45] MOEBUS FF, FITZKY BU, LEE JN i in. Molecular cloning and expression of the human Δ7-sterol reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1899–1902.
[46] NEVO S, BENDERLY A., LEVY J. i in. Smith-Lemli-Opitz syndrome in an inbred family. *Am J Dis Child* 1972; **124**: 431–433.
[47] NOWACZYK MJM, WHELAN DT, HESHKA TW i in. Smith-Lemli-Opitz syndrome: a treatable inherited error of metabolism causing mental retardation. *CMAJ* 1999; **2**: 161–170.
[48] NOWACZYK MJM, NAKAMURA LM, ENG B. Frequency and ethnic distribution of the common DHCR7 mutation in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 2001; **102**: 383–386.
[49] NOWACZYK M J M, WAYE J S: The Smith-Lemli-Opitz syndrome: a novel metabolic way of understanding developmental biology, embriogenesis, and dysmorphology. *Clin Genet* 2001; **59**: 375–386.
[50] NOWACZYK MJM, HESHKA TW, KRATZ LE, KELLY RI. Difficult prenathal diagnosis in a fetus affected with mild Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 2000; **11**(95): 396–398.
[51] OPITZ J.M, ZELLWEGER H, SHANNON WR i in. The RSH syndrome. BD: *OAS* 1969; **2**: 42–45.
[52] PEPINSKY RB, ZENG C, WEN D, RAYHORN P i in. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998; **273**: 14037–14045.
[53] PINSKY L, DIGEORGE AM. A familial syndrome of facial and skeletal anomalies associated with genital abnormality in the male and normal genitals in the female. *J Pediatr* 1965; **66**: 1049–1054.
[54] PORTER JA, VON KESSLER DP, EKKER SC i in. The product of hedgehog autoproteolytic cleaveage active in local and long-range signaling. *Nature* 1995; **374**: 363–366.
[55] PORTER JA, EKKER SC, PARK WJ i in. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 1996; **86**: 21–34.
[56] PORTER JA, YOUNG KE, BEACHY PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996; **274**: 255–259.
[57] RUBENSTEIN JL, BEACHY PA. Patterning of the embryonic forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 1998; **8**(1): 18–26.
[58] RYAN AK, BARTLETT K, CLAYTON P i in. Smith-Lemli-Opitz: a variable clinical and biochemical phenotype. *J Med Genet* 1998; **35**: 558–565.
[59] SMITH DW, LEMLI L, OPITZ JM. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr* 1964; **64**: 210–217.
[60] SHACKLETON CHL, ROITMAN E, KRATZ LE i in. Equine type estrogens produced by a pregnant woman carrying a Smith-Lemli-Opitz syndrome fetus. *J Clin Endocrinol Met* 1999; **84**(3): 1157–1159
[61] STONE DM, HYNES M, ARMANINIM i in. The tumor suppressing gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 1996; **384**: 129–134.
[62] TINT GS. Cholesterol defect in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 1993; **47**: 573–574.
[63] TINT GS, IRONS M, ELIAS ER. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med* 1994; **330**: 107–113.
[64] TSUKAHARA M, FUJISAWA K, YAMAMOYO K i in. Smith-Lemli-Opitz Syndrome in Japan. *Am J Med Genet* 1998; **75**: 118–119.
[65] WALLACE M, ZORI RT, ALLEY T i in. Smith-Lemli-Opitz syndrome in a female with a *de novo*, balanced translocation involving 7q32. Probable disruption of an SLOS gene. *Am J Med Genet* 1994; **50**: 368– 372.
[66] WASSIF CA, MASLEN C, KACHILELE-LINJEWILE S i in. Mutations in the human sterol Δ7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 55–62.
[67] WATERHAM HR, WIJBURG FA, HENNECAM RCM. i in.: Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *Am J Human Genet* 1998; **63**: 329–338.

http://rcin.org.pl

[68] WATERHAM HR,WANDERS RJA. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Bioch Bioph Acta* 2000; **1529**: 340–356.
[69] WETTERAU JR, AGGERBECK LP, BOUMA ME i in. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992; Nov 6 258:5084, 999–1001.
[70] WILLIAMS KP, RAYHORN P, CHI-ROSSO G i in. Functional antagonists of sonic hedgehog reveal the importance of the N terminus for activity. *J Cell Sci* 1999; **112**: 4405–4414.
[71] WITCH-BAUMGARTNER M, FITZKY BU, OGORELKOVA M i in. Mutational spectrum in the Δ7-sterol reductase gene and genotype – fhenotype correlation in 84 patients with Smith-Lemli-Opitz. *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 402–412.
[72] WITCH-BAUMGARTNER M, CIARA E, LOFFLER HJ i in. Frequency gradients of DHCR7 mutations in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome in Europe; evidence for different origins of common mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**(1): 45–50.
[73] VILLAVICENCIO EH, WALTERHOUSE DO, IANNACCONE PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 1047–1054.
[74] YU H, LEE MH, STARK L. Spectrum of delta(7)-dehydrocholesterol reductase mutations in patients with the Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; **22**(9)9: 1385–1391.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 20.06.2002 r.
Przyjęto: 10.12.2002 r.
Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa-Międzylesie,
e-mail walasek@czd.waw.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (311–323)

WIRUS BRODAWCZAKA LUDZKIEGO A PROCES APOPTOZY*

HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND APOPTOSIS

Joanna RESZEĆ[1], Mariola SULKOWSKA[1], Katarzyna GUZIŃSKA-USTYMOWICZ[1], Renata ZALEWSKA[2], Stanisław SULKOWSKI[1]

[1]Zakład Patomorfologii Klinicznej, [2]Klinika Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie: Znaczenie wpływu infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) na procesy apoptozy i kancerogenezy było przedmiotem wielu badań, lecz wciąż jest mało poznane. Opracowanie ma na celu przedstawienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej wpływu infekcji HPV na wybrane aspekty procesów życia i śmierci komórek. Apoptoza jest złożonym procesem prowadzącym do śmierci komórki, w którym istotną rolę odgrywają białka z rodziny BCL-2, jak również białka regulujące cykl komórkowy m.in. P53 oraz pRB. Znaczenie infekcji HPV wiąże się głównie z promowaniem procesów przeżycia m.in. poprzez inaktywację białek P53, pRB, p107, interakcję onkoprotein wirusowych z cyklinami cyklu komórkowego, degradację białek proapoptotycznych (BAX, BAK), co w konsekwencji prowadzi do nadekspresji białek antyapoptotycznych, m.in. białka BCL-2. Opierając się na danych literaturowych opisano oddziaływanie onkoprotein wirusowych na szereg białek regulujących cykl komórkowy, proliferację i apoptozę (P53, BCL-2, BAX, BAK i pRB). Szczególną uwagę poświęcono roli, jaką w hamowaniu apoptozy odgrywają produkty genów wirusa E6 i E7. Przebieg infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego wydaje się mieć znaczącą rolę w zaburzeniach kaskady procesów apoptozy, co może prowadzić do niekontrolowanej proliferacji komórek oraz rozwoju zmian nowotworowych.

Słowa kluczowe: apotoza, HPV, BAK, BAX, Bcl-2, P53, pRB.

Summary: The importance of human papillomavirus infection on apoptosis and cancerogenesis was a subject of many investigations and it is still evaluated. The aim of the reviev is to present recent knowledge concerning the influence of human papillomavirus on chosen aspects of cell live and death processes. Apoptosis is a quite complex process leading to cell's death, in which a main role play the proteins of BCL-2 family and cell cycle regulating proteins such as P53 and pRB. The meaning of HPV

* Praca wykonana w ramach grantu KBN nr 3 PO5B 02123.

http://rcin.org.pl

infection is associated with surviving process promotion during inactivation of many proteins: P53, pRB, p107, and interaction of viral oncoproteins with cell cycle cyclines, degradation of proapoptotic proteins (BAX, BAK) what in consequence leads to overexpression of antiapoptotic proteins such Bcl-2 proteins. Basing on recent data we described the influence of viral oncoproteins on many cell cycle regulating proteins, proliferation and apoptosis regulating factors (P53, Bcl-2, BAK, BAX, pRB). A particular attention is put on the role, which play viral genes E6 and E7 products in braking apoptosis processes. The course of viral infection seem to play a significant role in cascade of apoptosis processes damage, what may leads to uncontrolled cells proliferation and neoplastic changes development.

Key words: apoptosis, HPV, BAK, BAX, Bcl-2, P53, pRb.

WSTĘP

Wirusy brodawczaka stanowią różnorodną grupę wirusów, należących do rodziny *Papillomaviridae*. Od wielu lat prowadzone badania nie określiły jednoznacznie, jaki wpływ mają wirusy brodawczaka ludzkiego (*Human Papillomavirus* – HPV) na proces śmierci komórki oraz rozwój zmian nowotworowych. Papillomawirusy należą do małych wirusów typu DNA. Genom ich stanowi kolisty, dwuniciowy DNA, zbudowany z około 8000 par zasad. Od 1979 r. poznano ponad 100 typów wirusów *Papilloma*. Oprócz ludzkiego wirusa brodawczaka istnieją także typy: psi, bydlęcy i króliczy, które są wysoce specyficzne wobec danego gatunku. Drogami zakażenia epiteliotropowym wirusem HPV są przede wszystkim: droga kontaktu seksualnego, droga wertykalna oraz droga okołoporodowa. Ze względu na rodzaj wywoływanych przez wirusa zmian wyodrębniono typy infekujące skórę i śluzówkę, odpowiadające za rozwój brodawczaka i raka płaskonabłonkowego oraz zmian o typie *epidermodysplasia verruciformis*. Przeszło 20 typów wirusów HPV infekuje drogi płciowe prowdząc do rozwoju brodawczaków, kłykcin kończystych, dysplazji oraz raka płaskonabłonkowego i prawdopodobnie gruczolakoraka szyjki macicy [24,29,50]. Ze względu na stopień potencjału onkogennego wyróżniono grupę HPV niskiego ryzyka onkogennego (HPV 2,6,7,10,11,13,32,40,42,43,44) i wysokiego ryzyka onkogennego (HPV 16,18,31,-33,34,35,39,45,52). Czynnikami predysponującymi do zakażenia są: wiek, aktywność seksualna, immunosupresja, radioterapia, chemioterapia, palenie papierosów, doustna antykoncepcja, zakażenia okołoporodowe [2,51,52]. W zainfekowanych komórkach warstwy podstawnej nabłonka płaskiego nie dochodzi do pełnego cyklu replikacyjnego wirusa (komórki niepermisywne) i powstają nieliczne kopie genomu wirusowego zlokalizowane w postaci episomów lub w postaci zintegrowanej do DNA gospodarza w jądrze komórkowym. Do pełnego cyklu replikacyjnego wirusa z wytworzeniem jego cząstek potomnych dochodzi jedynie w dojrzałych komórkach nabłonka, tzw. keratynocytach. Namnożenie cząstek wirusa w komórkach powierzchownej warstwy nabłonka prowadzi do zmian w komórce i pojawienia się charakterystycznych koilocytów jako morfologicznego wykładnika infekcji wirusem HPV [50,51,52]. W genomie HPV można wyróżnić dwa regiony kodujące, przedzielone krótkim regionem niekodującym, pełniącym funkcje regulatorowe. Wszystkie ramki odczytu znajdują się

http://rcin.org.pl

na jednej nici DNA. Region wczesny E zawiera do 8 ramek odczytu (ORFs – *Open Reading Frames*), które kodują białka niezbędne w procesach replikacji wirusa oraz transformacji komórek gospodarza. Ich ekspresja ma miejsce w warstwie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Białko E1 pełni funkcje regulujące replikację DNA i utrzymujące DNA wirusa w formie episomalnej. ORF E2 znajduje się na końcu 3' regionu wczesnego i pokrywa się częściowo z ramką E1, reguluje ekspresję wirusowych promotorów, pełniąc funkcję aktywatora lub represora transkrypcji, współzawodnicząc z białkami TBP w ich wiązaniu z promotorem. Ponadto E2 może powodować represję podstawowej aktywności promotora genów późnych HPV [46,51]. ORF E4 położona jest w obrębie ramki E2, koduje białko pojawiające się w późnym etapie replikacji wirusa, które wiąże się z pośrednim typem włókien keratyny i powoduje zapadanie się cytoszkieletu komórki gospodarza [51,52]. ORF E5 koduje białko zlokalizowane głównie w błonach retikulum endoplazmatycznego oraz aparatu Golgiego komórek zainfekowanych, zmieniające działanie kinaz białkowych, receptorów EGF, EDGF, wzmacniające transdukcję sygnału do jądra komórkowego oraz za pośrednictwem EGF indukujące aktywność kinazy MAP, co promuje sygnały wzrostu komórek i hamuje czynność pompy sodowej w endosomach [2,50,51]. ORF E6 koduje małe białko jądrowe zdolne do wiązania się z białkiem P53, które jest istotnym regulatorem cyklu komórkowego gospodarza. Produkt genu E7 wpływa na procesy decydujące o życiu lub śmierci zainfekowanej komórki, wpływając m.in. na białka cyklu komórkowego – RB, p107, p130, cykliny i kinazy zależne od cyklin [2,14,52].

Rola wirusa brodawczaka ludzkiego w procesie przeżycia lub śmierci zainfekowanej komórki nie jest do końca jasna, chociaż wpływ HPV na szereg czynników regulujących oba procesy udowodniono w wielu badaniach [1,3,5,7,8,10,15,18,20,22,27,33,37,38,42,43,49].

APOPTOZA – PROCES UMIERANIA KOMÓRKI

Apoptoza (termin pochodzący z języka greckiego, oznaczający spadanie płatków z kwiatów lub liści z drzew) jest szeregiem zmian morfologicznych i biochemicznych zachodzących w komórce, prowadzących do obumarcia komórki [16,25]. Procesowi temu towarzyszy obkurczenie się cytoplazmy komórkowej, uwolnienie cytochromu c, kondensacja i degradacja chromatyny jądrowej, ekspozycja na powierzchni błony komórkowej niektórych fosfolipidów, m.in. fosfatydyloseryny, a w końcowym efekcie podział na małe, otoczone błoną komórkową ciałka apoptotyczne [25,32,39,47]. Obumieranie komórki jest naturalnym procesem zachodzącym podczas embriogenezy, wzrostu i rozwoju narządów oraz ich inwolucji [25]. W procesie rozwoju i dojrzewania układu nerwowego ssaków umiera ok. 50% neuronów wyjściowej populacji, apoptozie ulega część dojrzewających limfocytów T po segregacji w grasicy, a także komórki nieodwracalnie uszkodzone w wyniku mutacji w genomie [39].

Na rozpoczęcie w komórce procesu apoptozy mają wpływ czynniki regulujące wzrost i proliferację komórkową, hormony, reaktywne formy tlenu, uszkodzenia DNA

http://rcin.org.pl

pod wpływem promieniowania ultrafioletowego lub chemoterapeutyków oraz specyficzne cząstki wiążące się z receptorami znajdującymi się na powierzchni błony komórkowej (*Tumor Necrosis Factor-alpha* – TNF-α, Limfotoksyna, *Fas Ligand* – FasL). Apoptozę mogą indukować czynniki wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe. Sygnały wewnątrz-komórkowe zapoczątkowują uwolnienie czynnika Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) z kompleksu, w skład którego wchodzi także znajdujące się na powierzchni błony komórkowej białko BCL-2. Następnie czynnik Apaf-1 tworzy kompleks z uwolnionym z mitochondrium cytochromem c, który wiąże się z kaspazą 9 i przy udziale ATP tworzy apoptosom znajdujący się w cytoplazmie. Kompleks ten aktywuje kolejne kaspazy uaktywniając tym samym kaskadę enzymów i białek prowadząc do proteolizy białek komórkowych, degradacji jądrowego DNA i fagocytozy. Apoptoza indukowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi związana jest z aktywacją receptorów Fas (określanego także jako receptor CD95) i TNF (*Tumor Necrosis Factor*), które są integralnymi białkami błony komórkowej. Związanie komplementarnych aktywatorów, jakimi są *Fas Ligand, Tumor Necrosis Factor- alpha,* powoduje transmisję sygnału do cytoplazmy i prowadzi do aktywacji kaspazy 8, która inicjuje dalsze etapy procesu apoptozy [16,25,31,32,39].

ROLA BIAŁEK Z RODZINY BCL-2, BIAŁKA P53 I KASPAZ W PROCESIE APOPTOZY

Istotną rolę w regulacji procesu apoptozy odgrywa niewątpliwie białko P53, które jest regulatorem transkrypcji DNA. Wiążąc się z DNA białko P53 rozpoznaje uszkodzenia w DNA i pośredniczy w procesie zahamowania cyklu komórkowego lub promuje proces apoptozy, jeżeli uszkodzenie DNA jest na tyle duże, że uruchamiane procesy naprawcze nie są wystarczające, aby przywrócić prawidłową funkcję komórki [16,35]. Białko P53 znajduje się w cytozolu w bardzo niskim stężeniu. Jego aktywność regulowana jest przez czynnik transkrypcyjny MDM2 (*Murine Double Minute 2*), który jest negatywnym regulatorem poziomu ekspresji białka P53. Ekspresja P53 umożliwia zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1. Białko P53 kontroluje prawidłowość cyklu komórkowego przy udziale białka P21 oraz inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CDKs), odpowiedzialnych za przejście komórki z fazy G1 do S [13,16,20]. Kompleks cykliny D z CDK4 umożliwia fosforylację białka pRB i uwolnienie czynnika E2F, powodując jego translokację do jądra komórkowego, aktywację procesów transkrypcji i powstawanie wielu białek. Uszkodzenia komórki indukują procesy naprawcze, których konsekwencją jest nadekspresja białka P53, a następnie inhibitora cyklin (CDK 2,4,6) p21. Zahamowanie aktywności kinaz uniemożliwia fosforylację białka pRB i uwolnienie czynnika E2F zatrzymując cykl komórkowy w fazie G1 w celu naprawy DNA [21,31,32]. Jeżeli uszkodzenia DNA uniemożliwiają jego naprawę, dochodzi do uruchomienia szlaku apoptozy, w którym ogromną rolę odgrywają białka z rodziny BCL. Nazwa genów *bcl* (*B-Cell Leukemia/*

http://rcin.org.pl

Lymphoma) wiąże się z wykryciem ich w białaczkach i w chłoniakach wywodzących się z komórek B, gdzie protoonkogen bcl-2, zlokalizowany na chromosomie 18q21, w rezultacie translokacji dostaje się pod wpływ genu dla IgH na chromosomie 14q32 i w konsekwencji prowadzi do wzmożenia ekspresji i nadprodukcji białka BCL-2 [26]. Białka z rodziny BCL-2 są wysoce konserwatywnymi białkami, zbudowanymi z homologicznych sekwencji (BH1, BH2, BH3, BH4). Domeny te determinują zdolność do dimeryzacji białek należących do tej rodziny ułatwiając formowanie homo- i heterodimerów, a także interakcje z innymi białkami regulującymi apoptozę, lecz nienależącymi do rodziny BCL-2 [6,12,19,26]. Wśród rodziny białek BCL-2 znajdują się białka hamujące apoptozę – BCL-2, BCL-Xl, BCL-w, MCL-1, A1 – białka promujące apoptozę (białka BAX, BAK, BOK) oraz białka BAD, BIK, BID, które również są promotorami śmierci komórki. Spośród wszystkich znanych dotychczas białek komórkowych BCL-2 jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy. Gen kodujący białko BAX zlokalizowany jest na chromosomie 19q13,3. Białko BAX ma wysokie powinowactwo jedynie do czterech antyapoptotycznych białek: BCL-2, A1 (z którymi tworzy heterodimery antyapoptotyczne), BCL-Xl i MCL-1 (z którymi tworzy heterodimery proapoptotyczne) [36]. Obserwuje się nadekspresję białka BAX i białka BCL-2 w komórkach nowotworowych. W przebiegu cyklu komórkowego obserwowano nadekspresję białka BAX w fazie G1/S [12,19,25,26,36]. W procesie apoptozy białko BAX migruje do błon mitochondrium, wiąże się z białkiem BCL-2 i tworząc heterodimery warunkuje powstawanie porów w błonie mitochondrialnej, które umożliwiają przepływ jonów. Efektem tego jest uwolnienie cytochromu c i tworzenie apoptosomu. Przemieszczenie białka BCL-2 z cytozolu do błon mitochondrialnych w czasie apoptozy wyprzedza takie symptomy apoptozy, jak obkurczenie się komórki i kondensację chromatyny. Białko BCL-2 odgrywa rolę regulatora apoptozy przez oddziaływanie na szereg procesów komórkowych: zwiększa przepuszczalność błon mitochondrium (białka BAX i BAK razem z białkami VDAC – *Voltage-Dependent Anion Chanel* tworzą kanały błonowe), kontroluje poziom jonów potasu, wodoru, chloru oraz wapnia wewnątrzkomórkowego, reguluje wypływ z mitochondriów czynników proapoptotycznych, takich jak cytochrom c i AIF, aktywuje enzymy istotne w procesie apoptozy, m.in. kaspazy i DN-azy [12,16,19,25,26,31,35,45,47].

Kaspazy-proteazy z aktywnym centrum zawierającym cysteinę obecne są w cytoplazmie. Opisano ponad 13 typów kaspaz, z których część odgrywa istotną rolę w procesach zapalnych, część w procesie apoptozy. Aktywacja kaspaz związana jest z kaskadą procesów inicjujących apoptozę, jedne kaspazy aktywują inne. Z tego powodu dokonano podziału na kaspazy będące inicjatorami (kaspaza 2,8,9,10) oraz kaspazy efektorowe (kaspaza 3,6,7) [16,31,32]. Efektem aktywacji kaspaz jest: trawienie białek cytoszkieletu, uszkodzenie błony jądrowej, uwolnienie nukleaz trawiących DNA. Do substratów kaspaz zaliczane są również: podjednostka kinazy DNA-PK, uczestnicząca w wykrywaniu uszkodzeń jądrowego DNA komórkowego; białko ICAD (*Inhibitor of Caspase-Activated DNAse*) – proteoliza białka ICAD uwalnia białko CAD, które trawi DNA komórki ulegającej apoptozie; białko pRB, regulujące cykl komórkowy; białko MDM2 wiążące się z białkiem P53 i powodujące jego inaktywację i degradację;

http://rcin.org.pl

białka cytoszkieletu komórki, m.in. laminy, aktyny oraz spektryny. Inhibitory kaspaz (IAPs) selektywnie hamują efekt działania kaspaz, hamując tym samym proces apoptozy. Szczególnie wysoką ekspresję inhibitorów kaspaz stwierdza się w komórkach nowotworowych [16,32,33].

PRZEBIEG PROCESU APOPTOZY

Rozpoczęcie procesu apoptozy zależy od szeregu czynników, m.in. „ligandów śmierci" FasL (*Fas Ligand*) oraz TNF (*Tumor Necrosis Factor*); białek m.in. granzymy i perforyny, które wiążąc się z częścią cytoplazmatyczną receptora Fas i TNF prowadzą do aktywacji sfingomielinazy i wytwarzania ceramidu jako wtórnego przekaźnika, co aktywuje kaspazy. Ich substratami stają się poli(ADP-rybozo)polimeraza zaangażowana w procesy naprawcze DNA, ponadto lamina B1, topoizomeraza I,II i aktyna. Aktywacja kaspaz odbywa się przy udziale czynników aktywujących apoptozę – Apaf-1, Apaf-2, Apaf-3 (*apoptosis protease-activating factors*). Dalszy wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej prowadzi do uwolnienia czynnika AIF (*apoptosis inducing factor*), który opuszczając mitochondrium ulega translokacji do jądra komórkowego. Tam aktywuje szereg kaspaz (m.in. kaspazę 3), a następnie przy pomocy jądrowych endonukleaz powoduje fragmentację DNA [25,37,47]. Z mitochondrium uwalniany jest również cytochrom c , który wiążąc się z czynnikiem Apaf-1, kaspazą 3 oraz ATP powoduje zapoczątkowanie kaskady procesów apoptozy.

Białkami regulującymi przepuszczalność błon mitochondrialnych są opisane wyżej białka z rodziny BCL-2. Białko BCL-2, jak i białko BAX tworzą kanały jonowe w błonach komórkowych o odmiennej przepuszczalności dla poszczególnych jonów: kanał BCL-2 jest specyficzny dla jonów potasu i wapnia, natomiast kanał BAX dla jonów chloru. Uwalniane z retikulum endoplazmatycznego jony wapnia uczestniczą w aktywacji endonukleaz, odpowiedzialnych za fragmentację DNA oraz aktywacji szeregu genów włączonych w proces apoptozy (c-Jun, c-Fos, c-Myc). Aktywne proteazy, tj. kaspazy i kalpainy, biorą udział w proteolizie szeregu białek jądrowych (PARP, pRB, laminy, topoizomerazy I, II) oraz białek cytoplazmatycznych (aktyna, fodryna). Proteoliza topoizomeraz powoduje fragmentację DNA, rozbicie cytoszkieletu, tworzenie ciałek apoptotycznych i fagocytozy bez powstania odczynu zapalnego [25].

WPŁYW WIRUSA BRODAWCZAKA LUDZKIEGO NA PRZEBIEG APOPTOZY

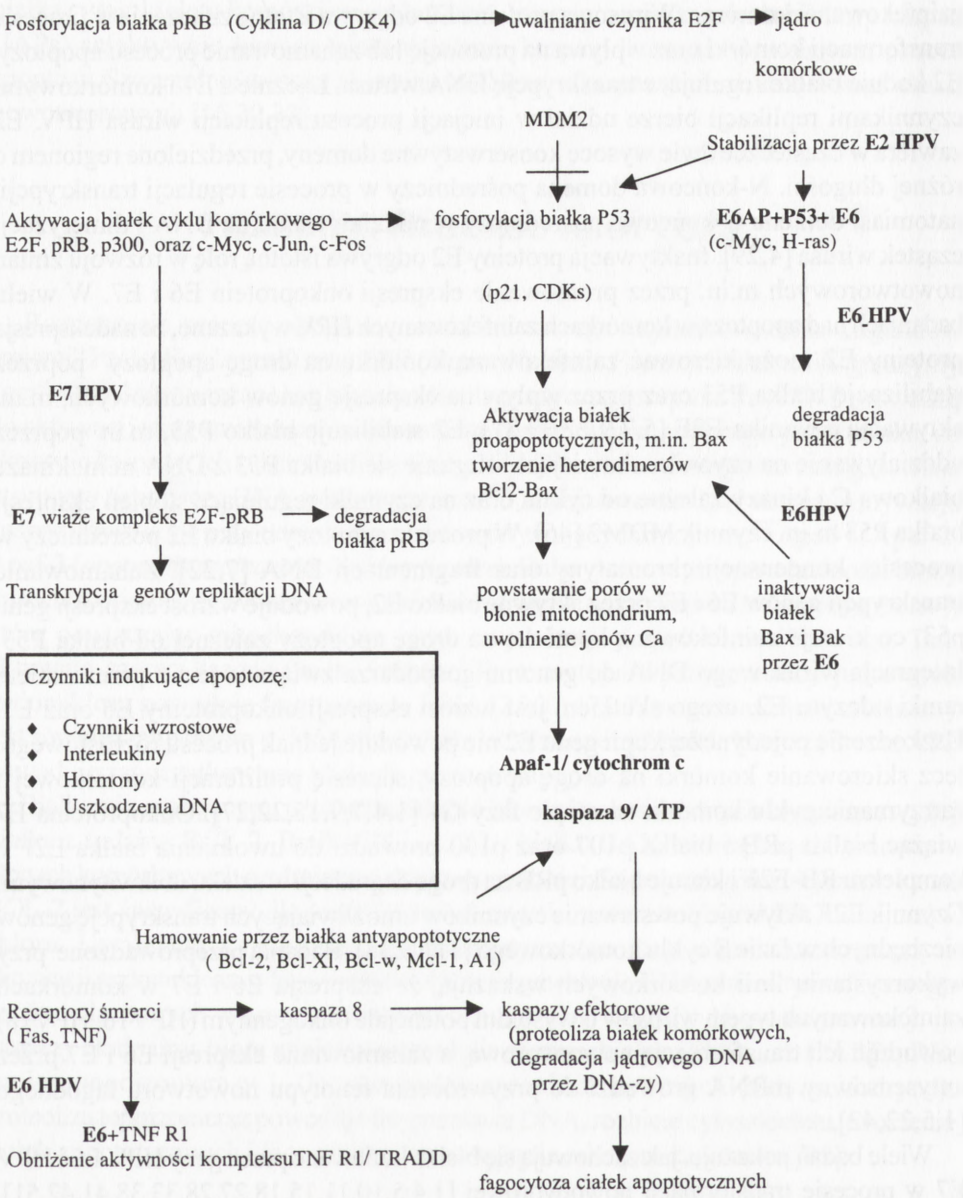
Proces apoptozy regulowany jest nie tylko przez czynniki komórkowe, ale także przez czynniki pozakomórkowe, m.in. wirusy, w tym wirusy brodawczaka ludzkiego, którego wpływ na proces śmierci komórki umożliwia replikację i przeżycie wirusa w

http://rcin.org.pl

zainfekowanej komórce. Wirusowa proteina E2 odgrywa istotne znaczenie w procesie transformacji komórki oraz wpływa na promocję lub zahamowanie procesu apoptozy. E2 koduje białko regulujące transkrypcję DNA wirusa. Łącznie z E1 i komórkowymi czynnikami replikacji bierze udział w inicjacji procesu replikacji wirusa HPV. E2 zawiera w cząsteczce dwie wysoce konserwatywne domeny, przedzielone regionem o różnej długości. N-końcowa domena pośredniczy w procesie regulacji transkrypcji, natomiast domena C-końcowa pośredniczy w oddziaływaniu na DNA i dimeryzacji cząstek wirusa [4,29]. Inaktywacja proteiny E2 odgrywa istotną rolę w rozwoju zmian nowotworowych m.in. przez promowanie ekspresji onkoprotein E6 i E7. W wielu badaniach nad apoptozą w komórkach zainfekowanych HPV wykazano, że nadekspresja proteiny E2 może kierować zainfekowaną komórkę na drogę apoptozy poprzez stabilizację białka P53 oraz przez wpływ na ekspresję genów komórkowych, m.in. aktywację czynnika E2F [5,7,9,22,33,37]. E2 stabilizuje białko P53, m.in. poprzez oddziaływanie na czynniki ułatwiające wiązanie się białka P53 z DNA m.in. kinazę białkową C i kinazy zależne od cyklin oraz na czynniki regulujące stopień ekspresji białka P53 m.in. czynnik MDM2 [46]. W procesie apoptozy białko E2 pośredniczy w procesie kondensacji chromatyny oraz fragmentacji DNA [7,22]. Zahamowanie transkrypcji genów E6 i E7 przez aktywne białko E2, powoduje wzrost ekspresji genu p53, co kieruje zainfekowaną komórkę na drogę apoptozy zależnej od białka P53. Integracja wirusowego DNA do genomu gospodarza związana jest z przerwaniem ramki odczytu E2, czego skutkiem jest wzrost ekspresji onkoproteiny E6 oraz E7. Uszkodzenie pojedynczej kopii genu E2 nie powoduje jednak procesu rozrostowego, lecz skierowanie komórki na drogę apoptozy, supresję proliferacji komórkowej i zatrzymanie cyklu komórki na etapie fazy G1 [1,4,7,9,15,22,27]. Onkoproteina E7 wiążąc białko pRB i białka p107 oraz p130 prowadzi do uwolnienia białka E2F z kompleksu RB-E2F i kieruje białko pRB na drogę degradacji w szlaku ubikwitynowym. Czynnik E2F aktywuje powstawanie czynników umożliwiających transkrypcję genów niezbędnych w fazie S cyklu komórkowego [11,13,38]. Badania przeprowadzone przy wykorzystaniu linii komórkowych wskazują, że ekspresja E6 i E7 w komórkach zainfekowanych typem wirusów o wysokim potencjale onkogennym (HPV16, HPV18) powoduje ich transformację nowotworową, a zahamowanie ekspresji E6 i E7 przez antysensowny mRNA prowadzi do przywrócenia fenotypu nowotworu łagodnego [1,5,22,42].

Wiele badań pokazuje, jak zachowują się białka kodowane przez geny HPV E6 i HPV E7 w procesie transformacji nowotworowej [1,4,5,10,11,15,18,27,28,33,38,41,42,51]. Powodują one upośledzenie procesu kontroli regulacji cyklu komórkowego i dojrzewania komórki. Produktem genu HPV E6 jest białko składające się ze 151 aminokwasów, zlokalizowane w macierzy jądrowej i błonach wewnątrzkomórkowych, z wyjątkiem błony jądrowej. Jak już wspomniano, ORF E6 koduje białko jądrowe o zdolności wiązania białka P53. Procesy inaktywacji białka P53 w drodze wiązania z E6, jak również w wyniku mutacji genu p53 mogą odgrywać istotną rolę w procesach transformacji nowotworowej. Konsekwencją związania przez onkoproteinę E6 białka P53 jest jego proteolityczna degradacja. Do asocjacji onkoproteiny E6 z białkiem P53 niezbędne jest białko

http://rcin.org.pl



RYCINA 1. Przypuszczalny wpływ białek wirusa brodawczaka ludzkiego (E2, E6, E7) na poszczególne etapy procesu apoptozy

komórkowe E6-AP. Kompleks E6/E6-AP funkcjonuje jako element szlaku ubikwitynacji (ligaza ubikwityny), prowadząc do degradacji białka P53. Ponadto oddziaływanie E6 z produktami transkrypcji genów *c-myc* i *H- ras* wydaje się być konieczne w procesie inaktywacji białka P53 [2,10,18]. Istnieją także badania dowodzące możliwości

http://rcin.org.pl

wiązania przez wirusową proteinę E6 wielu innych białek komórkowych: odpowiadających za przebieg procesów replikacji i transkrypcji- p300/CBP, IRF-3, hMcm7; białek zaangażowanych w procesy apoptozy – BAK, c-Myc; białek wpływających na przebieg różnicowania się komórek nabłonka – E6BP/ERC-55 oraz białek mających wpływ na interakcje międzykomórkowe i kontrolę proliferacji – hDLG, hScrib, MAGI-1, MUPP1 [5,30,45,52]. Opisano również możliwość zahamowania przez białko E6 apoptozy indukowanej przez TNF oraz P53. TNF indukuje apoptozę w komórkach zainfekowanych niektórymi wirusami przez tworzenie kompleksów z TRADD (*TNF R1-associated death domain*) oraz FADD (*Fas-associated death domain*), które aktywując kaspazę 8 wprowadzają komórkę na drogę śmierci. E6 wiąże się z TNF R1, co powoduje obniżenie aktywności kompleksu TNF R1/ TRADD w obecności E6. W badaniach doświadczalnych wykazano ponadto obniżenie ekspresji enzymów pro-apoptotycznych: kaspazy 3 i kaspazy 8 w komórkach zainfekowanych wirusem HPV [8,10].

Onkoproteina E7, zbudowana z 98 aminokwasów, jest zlokalizowana przede wszystkim w jądrze komórkowym. Składa się z 3 domen: N-końcowych: regionu konserwatywnego 1 (CR1) i regionu konserwatywnego 2 (CR2) oraz C-końcowego regionu konserwatywnego 3 (CR3). Docelowym białkiem E7 jest białko pRB. Białko pRB wiążąc się z czynnikiem E2F i HDACs hamuje transkrypcję [2,11,44]. Nadekspresja onkoprotein E7 i E6 promuje procesy przeciwstawne do apoptozy. E7 koduje białko jądrowe o zdolności wiązania i inaktywacji białka p107 i pRB, pełniących ważne funkcje w regulacji cyklu komórkowego. Utrata funkcji białka pRB spowodowana mutacjami w jego genie jest obserwowana w wielu zmianach nowotworowych. Wirusowe białko E7 może wpływać na kompleksy utworzone przez białka z rodziny RB z czynnikami transkrypcyjnymi E2F oraz białkiem c-Myc, powodując ich degradację. W wyniku ekspresji onkoproteiny E7 wzrasta stężenie wolnego czynnika transkrypcyjnego E2F, co w konsekwencji prowadzi do uruchomienia transkrypcji genów mających promotory zależne od E2F i umożliwia przejście komórki z fazy G1 do fazy S i dalej do syntezy DNA [1,2,4,11,15,29,34]. Mutacje w regionie ORF E7 uniemożliwiają wiązanie białek pRB i p107 oraz hamują aktywność transformującą w komórce gospodarza. W fazie S cyklu komórkowego onkoproteina E7 inaktywuje kompleks p107/Cdk2, który fizjologicznie związany jest z E2F. Ponadto opisano możliwość wpływu E7 na inne białka komórkowe: cyklinę A, cdc2 zależną kinazę, które regulują przejście komórki do fazy cyklu komórkowego S i G2/M. E7 wpływając na kompleks cyklina A/ Cdk2 może zapobiegać inaktywacji E2F/ DP1 w fazie S, co powoduje utratę kontroli nad cyklem komórkowym i upośledza zgodność replikacji DNA. Białko E7 tworzy również kompleks z cykliną E, kontrolującą przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego, łącznie z białkiem p107 [1,11,14,15,38,42,44,51,52].

Ekspresja onkoprotein E6 i E7 kontrolowana jest przez białko wirusowe E2, białko komórkowe gospodarza YY1 oraz cytokiny prozapalne, m.in. TNF alfa, interleukinę 1, interferon gamma [51]. Ponadto E6 i E7 ulegają fosforylacji, przez co mogą w różnym stopniu wiązać się z białkami docelowymi. E6 jest fosforylowana przy udziale kinazy białkowej A (PKA), natomiast E7 przez kinazę białkową II (CKII) [14,23,51,52].

http://rcin.org.pl

WPŁYW WIRUSA BRODAWCZAKA LUDZKIEGO NA EKSPRESJĘ BIAŁEK UCZESTNICZĄCYCH W PROCESIE APOPTOZY

Zahamowanie apoptozy w komórkach zainfekowanych wirusem brodawczaka ludzkiego ma związek z inaktywacją białek proapoptotycznych m.in. białka BAX i BAK (zahamowanie apoptozy niezależne od inaktywacji białka P53). Proapoptotyczne białka BAX i BAK wykazują największą ekspresję w powierzchownych warstwach nabłonka płaskiego. W czasie infekcji wirusem HPV w tych komórkach dochodzi do wzmożonej replikacji wirusa, ponieważ są to komórki wysoko zróżnicowane (komórki permisywne). Onkoproteina E6 powoduje powstanie kompleksów białek BAK i BAX z białkiem szlaku ubikwitynacji E6AP, co podobnie jak w przypadku białka P53 powoduje degradację białek BAK i BAX [30,34,40,41]. Odpowiedzią na zaburzenia w obrębie genomu komórkowego jest zahamowanie cyklu komórkowego i wzrost aktywności „naprawczego" białka P53 lub skierowanie komórki na szlak apoptozy. W komórkach zainfekowanych HPV z powodu inaktywacji zarówno białka P53, jak i białek proapoptotycznych proces naprawczy ani apoptoza nie są możliwe. Związanie białek proapoptotycznych w konsekwencji powoduje zaburzenie równowagi między białkami apoptozy na korzyść białek antyapoptotycznych, co w konsekwencji powoduje immortalizację komórki. Świadczy to niewątpliwie o współudziale wirusa HPV w hamowaniu procesu apoptozy zarówno przez degradację białek regulujących cykl komórkowy, jak i białek promujących proces apoptozy.

Przystosowanie wirusa do przetrwania w komórkach nabłonka przejawia się w obecności onkoproteiny E6 nie tylko w jądrze komórkowym, lecz także w błonach pozajądrowych, gdzie zlokalizowane są białka BAX i BAK (błona mitochondrialna, retikulum endoplazmatyczne) [40,41]. Opisywano również możliwość transformacji komórki przez E6 niezależnie od degradacji białka P53 m.in. przez związanie się z białkiem wiążącym wapń ERC-55. Jednocześnie ekspresja białka BCL-2 związana z koekspresją onkoproteiny E6 i E7 oraz ze zmienioną funkcją białek ważnych w regulacji cyklu komórkowego, m.in. P53, cykliną A, cykliną B i czynnikiem apoptozy cdc-2, wzrasta wraz ze stopniem transformacji nowotworowej komórki, jak również ze stopniem przeżycia zainfekowanych keratynocytów [3]. Kluczowym momentem w nadekspresji białka BCL-2 jest inaktywacja białka P53 przez onkoproteiny wirusa HPV, czy to w drodze mutacji, czy też związania z onkoproteiną E6. Koh i wsp. [20] opisali zależność rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej od obecności mutacji genu p53, związania białka P53 przez wirusową onkoproteinę E6 i wzrostu ekspresji białka BCL-2 prowadzących do procesu nowotworowego. Cooper i wsp. [6] w badaniach, przeprowadzonychwśród kobiet z dysplazją szyjki macicy i z infekcją HPV, stwierdzili immunohistochemicznie nadekspresję białka BCL-2, szczególnie w komórkach podstawnych, nie stwierdzając jednak zależności pomiędzy nadekspresją białka BCL-2 a stopniem dysplazji nabłonka szyjki macicy. Tjalma i wsp.[43] nie znaleźli korelacji między ekspresją białek P53, BCL-2 oraz BAX a obecnością wirusa

http://rcin.org.pl

brodawczaka ludzkiego w raku szyjki macicy. Natomiast Thomas i Banks [40,41] wysunęli hipotezę, że w komórkach zainfekowanych HPV w początkowym etapie dochodzi do wzrostu ekspresji białek proapoptotycznych, natomiast w wyniku interakcji onkoproteiny E6 z białkiem BAX dochodzi do jego degradacji i tym samym nadekspresji białek antyapoptotycznych, m.in. białka BCL-2. Rogovskaya i wsp. [33] nie znaleźli oznak apoptozy w niezmienionych nabłonku, kłykcinach płaskich i kłykcinach kończystych, natomiast zaobserwowali nasilenie apoptozy w rakach przedinwazyjnych, szczególnie w górnej 1/3 części nabłonka. Podobne badania przeprowadzili Nair i wsp. [27] określając obecność procesów apoptozy metodą TUNEL oraz badając immunohistochemicznie ekspresję białek P53, BCL-2 oraz cykliny D1 i Ki-67 w zmianach nowotworowych szyjki macicy. Stopień nasilenia apoptozy korelował ze stopniem zaawansowania zmiany nowotworowej. Najniższy poziom ekspresji heterodimerów BAX/BCL-2 był związany głównie z infekcją HPV16 i HPV18.

Zaburzenia procesu apoptozy leżą u podłoża wielu zmian nowotworowych, w tym raka szyjki macicy, którego udowodnionym czynnikiem etiopatogenetycznym jest infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego. Na skutek integracji DNA wirusa do genomu gospodarza inaktywacji ulega wiele czynników warunkujących prawidłowy przebieg cyklu komórkowego oraz apoptozy. Ocena dynamiki rozwoju zmian nowotworowych w korelacji z obecnością wirusa HPV oraz ekspresją białek procesów śmierci i przeżycia komórki ma niewątpliwe znaczenie w zrozumieniu procesów HPV-zależnej transformacji nowotworowej, zwłaszcza w przypadku tych zmian nowotworowych, gdzie wysuwa się hipotezę wpływu wirusa brodawczaka ludzkiego na ich rozwój, tzn. zmian nowotworowych szyjki macicy, brodawczaków i raków płaskonabłonkowych jamy ustnej lub spojówki.

PIŚMIENNICTWO

[1] ALUNNI-FABBRONI M, LITTLEWOOD T, DELEU L, CALDEIRA S, GIARRE M, DELL' ORCO M, TOMMASINO M. Induction of S phase and apoptosis by the human papillomavirus type 16 E7 protein are separable events in immortalized rodent fibroblasts. *Oncogene* 2000; **19**: 2277–2285.

[2] ARENDS MJ, WYLLIE AH, BIRD CC. Papillomaviruses and human cancer. *Hum Pathol* 1990; **21**: 686–698.

[3] BRYCHTOVA S, BRYCHTA T, KOTRSOVA L, PILKA R, TICHY M, TICHA V, KOLAR Z. Expression of Bcl-2 in dysplastic and neoplastic cervical lesions in relation to cell proliferation and HPV infection. *Neoplasma* 2000; **47**: 143–147.

[4] BUTEL SJ. Viral arcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 405–426.

[5] BUTZ K, DENK C, ULLMANN A, SCHEFFNER M, HOPPE-SEYLER F. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6693–6697.

[6] COOPER K, HAFFAJEE Z, TAYLOR L. Bcl-2 immunoreactivity, human papillomavirus DNA, and cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 1999; **12**: 612–617.

[7] DESAINTES C, DEMERET KC, GOYAT S, YANIV M, THIERRY F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* 1997; **16**: 504–514.

http://rcin.org.pl

[8] DUERKSEN- HUGHES PJ, YANG J, SCHWARTZ SB. HPV 16 E6 blocks TNF- mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. *Virology* 1999; **264**: 55–65.
[9] FERRAN MC, MCBRIDE AA. Transient viral DNA replication and repression of viral transcription are supported by the C-terminal domain of the bovine papillomavirus type 1 E1 protein. *J Virol* 1998; **72**: 796–801.
[10] FILIPPOVA M, SONG H, CONNOLLY JL, DERMODY TS, DUERKSEN-HUGHES J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to TNF R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002 May [pub ahead of print]
[11] FLORES ER, ALLEN- HOFFMANN BL, LEE D, LAMBERT PF. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 2000; **74**: 6622–6631.
[12] GROSS A. The role of BCL-2 family members in apoptosis. BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life* 2001; **52**: 231–236.
[13] HICKMAN ES, BATES S, VOUSDEN KH. Perturbation of the p53 response by human papillomavirus type 16 E2. *J Virol* 1997; **71**: 3710–3718.
[14] HOWLEY P. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Research* 1991; **51**: 5019–5022.
[15] HWANG SG, LEE D, KIM J, SEO T, CHOE J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein- independent manner. *J Biol Chem* 2002; **277**: 2923–2930.
[16] ISRAELS LG, ISRAELS ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; **4**: 332–339.
[18] JACKSON S, STOREY A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000; **19**: 592–598.
[19] KEN, GODZIK A, REED C. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 2001; **276**: 12481–12484.
[20] KOH JY, CHO NP, KONG G, LEE JD, YOON K. P53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis. *Br J Cancer* 1998; **78**: 354–359
[21] LEPIK D, ILVES I, KRISTJUHAN A, MAIMETS T, USTAV M. P53 protein is a suppressor of papillomavirus DNA amplificional replication. *J Virol* 1998; **72**: 6822–6831.
[22] MASSIMI P, PIM D, BERTOLI C, BOUVARD V, BANKS L. Interaction between the HPV- 16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 1999; **18**: 7748– 7754.
[23] MASSIMI P, PIM D, KUHNE C, BANKS L. Regulation of the human papillomavirus oncoproteins by differential phosphorylation. *Mol Cell Biochem* 2001; **227**: 137–144.
[24] MCMURRAY HR, NGUYEN D, WESTBROOK TF, MCANCE DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 2001; **82**: 15–20.
[25] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom*1998; **25**: 315–334.
[26] MOTYL T, GAJKOWSKA B, PŁOSZAJ T, WARĘSKI P, ORZECHOWSKI A, ZIMOWSKA W, WOJEWÓDZKA U, RYNIEWICZ Z, REKIEL A. Rola Bax i Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 31–51.
[27] NAIR P, NAIR KM, JAYAPRAKASH PG, PILLAI MR. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res* 1999; **5**: 95–103.
[28] PILLAI MR, JAYAPRAKASH PG, NAIR MK. Bcl-2 immunoreactivity but not p53 accumulation associated with tumour response to radiotherapy in cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; **125**: 55–60.
[29] PORĘBA E. Biologia molekularna wirusów Papilloma. *Post Biol Kom* 1998; 25: 379–401.
[30] RAPP L, CHEN J. The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1378**: F1–19.
[31]REED J. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1415–1430.
[32]RENEHAN AG, BOOTH C, POTTEN CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; **322**: 1536–1538.
[33] ROGOVSKAYA SI, SUKHIKH GT, ZHDANOV AV, KOLOBOVA EA, EZHOVA LS. Apoptosis in woman uterine cervix in pathologies associated with human papillomavirus. *Bull Exp Biol Med* 2001; 131: 576–582.
[34] ROULSTON A, MARCELLUS RC, BRANTON P. Viruses and Apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999; **83**: 577–628.
[35]RUDIN CM, THOMPSON CB. Apoptosis and disease: regulation and clicical revalence of programmed cell death. *Annu Rev Med* 1997; **48**: 267–281.
[36] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYNKOWA D, KUROWSKA M. Rodzina genów bcl-2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 33–47.

http://rcin.org.pl

[37] SANCHEZ-PEREZ AM, SORIANO S, CLARKE AR, GASTON K. Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *J Gen Virol* 1997; **78**: 3009–3018.
[38] SEAVEY SE, HOLUBAR M, SAUCEDO L, PERRY ME. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 trough a mechanism independent of $p19^{ARF}$. *J Virol* 1999; **73**: 7590–7598.
[39] SULEJCZAK D. Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 527–568.
[40]THOMAS M, BANKS L. Inhibition of Bak- induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998; **17**: 2943–2954.
[41] THOMAS M, BANKS L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* 1999; **80**: 1513–1517.
[42] THOMPSON DA, ZACNY V, BELINSKY GS, CLASSON M, JONES DL, SCHLEGEL R, MUNGER K. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene* 2001; **20**: 3629–3640.
[43] TJALMA WA, WEYLER JJ, BOGERS JJ, POLLEFLIET C, BAAY M, GOOVAERTS GC, VERMORKEN JB, VAN DAM PA, VAN MARCK EA, BUYTAERT PM. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; **97**: 223–230.
[44] TOMASSINO M, CRAWFORD L. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *BioEssays* 1995; **17**: 509–518.
[45] TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. VDAC regulation by the Bcl-2 family proteins. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 1174–1181.
[46] WEBSTER K, PARISH J, PANDYA M, STERN PL, CLARKE AR, GASTON K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000; **275**: 87–94.
[47] WIDAK P. Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 583–597.
[48] DE VILLIERS EM. Heterogeneity of the Human Papillomavirus Group. *J Virol* 1989; **63**: 4898–4903.
[49] ZHANG B, SPANDAU DF, ROMAN A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin kerationcytes from UV B-irradiaton- induced apoptosis. *J Virol* 2002; **76**: 220–231.
[50] ZUR HAUSEN H, VILLIERS EM. Human Papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994; **48**: 427–447.
[51] ZUR HAUSEN H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1288**: 55–78.
[52] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 690–698.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 10.09.2002 r.
Przyjęto: 11.12.2002 r.
Ul. Wszyngtona 13 15-269 Białystok
e-mail: sulek@zeus.amb.edu.pl

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W PŁYTKACH KRWI*

ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BLOOD PLATELETS

Beata OLAS, Barbara WACHOWICZ

Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Reaktywne formy tlenu (RFT), do których należy anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($^{\cdot}OH$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy ($^1O_2$) czy rodnik tlenku azotu ($NO^{\cdot}$) są wysoce reaktywnymi cząstkami. Mogą reagować z lipidami, białkami czy DNA powodując nieodwracalne zmiany w strukturze tych związków. Płytki krwi, podobnie jak inne komórki, mogą wytwarzać RFT, które są wciągnięte w mechanizmy aktywacji tych komórek. Istnieje kilka dróg wytwarzania RFT w płytkach krwi. W komórkach stymulowanych różnymi fizjologicznymi agonistami (trombina, kolagen) potencjalnymi źródłami reaktywnych form tlenu są procesy związane z metabolizmem kwasu arachidonowego (przy udziale cyklooksygenazy czy 12-lipoksygenazy), przemiana fosfoinozytolu czy cykl glutationowy. RFT są także generowane w płytkach krwi przez aktywację oksydazy NADPH, oksydazy ksantynowej i syntazy $NO^{\cdot}$. Reaktywne formy tlenu mogą zachowywać się jako wtórne przekaźniki informacji w płytkach aktywowanych trombiną czy kolagenem. Ten przeglądowy artykuł przedstawia rolę RFT w płytkach krwi.

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, płytki krwi, glutation.

Summary: Reactive oxygen species (ROS), which include the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), the hydroxyl radical ($^{\cdot}OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1O_2$) and nitric oxide ($NO^{\cdot}$) are highly reactive substances. They can react with lipids, proteins and DNA, inducing irreversible changes of their biomolecular structure. Several studies have shown that blood platelets, in analogy to other circulating blood cells, can produce ROS, which are involved in the mechanisms of platelet activation. In blood platelets ROS may derive from different sources. Potential sources of reactive oxygen species in blood platelets stimulated by different physiological agonists (thrombin, collagen) are associated with arachidonic acid metabolism (via cyclooxygenase or 12-lipoxygenase), phosphoinositides and glutathione cycle. ROS are also generated in platelets by activation of NADPH oxidase, xanthine oxidase and $NO^{\cdot}$ synthase. Reactive oxygen species may behave as second messengers in thrombin- or collagen-activated platelets. This review presents the role of ROS in blood platelets.

Key words: reactive oxygen species, blood platelets, glutathione.

http://rcin.org.pl

*Praca finansowana z badań własnych UŁ 505/425

Spis skrótów: **ADP** – adenozynodifosforan, **ATP** – adenozynotrifosforan, **BSO** – butionylosulfoksyimina, **CG** – cyklaza guanylanowa, **COX** – cyklooksygenaza, **DAG** – sn-1,2-diacyloglicerol, **GMP** – cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan, H_2O_2 – nadtlenek wodoru, IP_3 – 1,4,5-trifosforan inozytolu, **MAP** – białko aktywowane przez mitogen, **NAD** – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać utleniona), **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynamidadeninowego (forma zredukowana), **NO**· – rodnik tlenku azotu, $O_2^{\cdot-}$ – anionorodnik ponadtlenkowy, $^1O_2$ – tlen singletowy, **OH** –rodnik hydroksylowy, **ONOO**$^-$ – nadtlenoazotyn, PIP_2 – fosfatydyloinozytolo-4,5-bifosforan, **PKT** – białkowe kinazy tyrozynowe, **RFT** – reaktywne formy tlenu, **ROS** (ang. *reactive oxygen species*), TXA_2 – tromboksan A_2

WSTĘP

Reaktywne formy tlenu (RFT) są wysoce reaktywnymi cząstkami, mającymi niesparowany elektron na zewnętrznej orbicie. Poszczególne reaktywne formy tlenu, do których należą anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($^{\cdot}OH$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy ($^1O_2$) czy rodnik tlenku azotu ($NO^{\cdot}$) pochodzić mogą ze źródeł endogennych i są produkowane zarówno w reakcjach enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. RFT mogą także pochodzić ze środowiska zewnętrznego (źródła egzogenne). RFT powstają w reakcjach wolnorodnikowych, np. w wyniku redukcji tlenu cząsteczkowego, peroksydacji lipidów i wytwarzania rodników semichinonowych. W dużych ilościach rodniki są tworzone podczas wybuchu tlenowego zachodzącego w fagocytach w wyniku działania oksydazy NADPH (generowanie $O_2^{\cdot-}$) znajdującej się w błonie komórkowej m.in. neutrofilów, makrofagów, monocytów czy eozynofilów. RFT mogą być też wytwarzane w wyniku działania m.in. oksydazy ksantynowej, lipoksygenazy, cyklooksygenazy, monooksygenazy P-450 i enzymów mitochondrialnych podczas fosforylacji oksydacyjnej [2, 28].

RFT mogą oddziaływać z licznymi związkami (lipidami, białkami czy kwasami nukleinowymi) powodując nieodwracalne zmiany w ich molekularnej strukturze, co prowadzi do zaburzeń biologicznej funkcji; niektóre produkty tych reakcji z czasem mogą być gromadzone w organizmie. Zmiany powodowane przez RFT w metabolizmie komórkowym są następstwem pęknięć łańcucha DNA, podniesienia stężenia jonów Ca^{2+} wewnątrz komórki, uszkodzenia błonowych nośników jonów lub specyficznych białek, obniżenia poziomu NAD^+ i ATP oraz uszkodzenia błony w wyniku peroksydacji lipidów. RFT odgrywają też ważną rolę w kontrolowaniu funkcji komórek oraz w przekazywaniu sygnałów w komórkach [2, 28]. Komórki wytworzyły szereg mechanizmów chroniących je przed działaniem RFT. W obronie uczestniczą zarówno niskocząsteczkowe antyoksydanty o stosunkowo prostej budowie chemicznej, jak i białka enzymatyczne (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa).

Wiele elementów układu krążenia: zarówno komórki krwi (leukocyty, monocyty), jak i komórki śródbłonka ściany naczynia krwionośnego są zdolne do wytwarzania znacznych ilości RFT. W ostatnich latach wykazano, że również płytki krwi, podobnie jak inne krążące elementy morfotyczne krwi, mogą wytwarzać różne reaktywne formy

http://rcin.org.pl

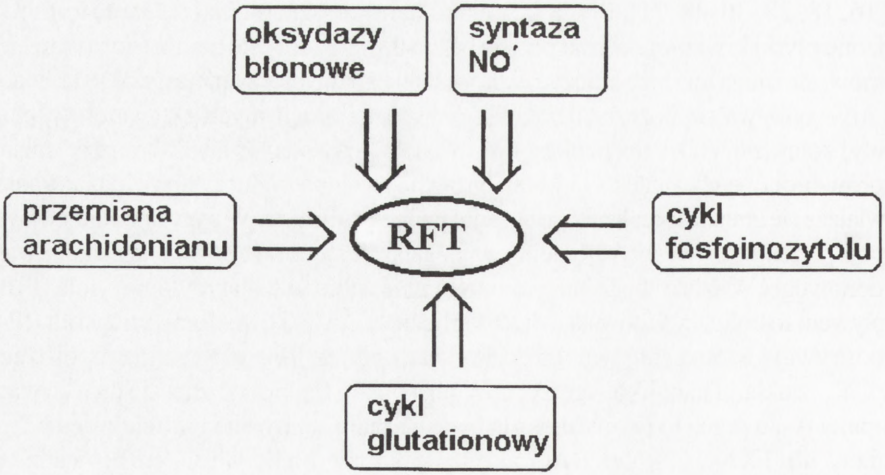
tlenu [16, 18, 28–30, 38, 71]. Płytki krwi są to najmniejsze, niemające jądra komórki. Pobudzone płytki krwi biorą udział przede wszystkim w procesie hemostazy, tworzeniu zakrzepów, ale mogą też uczestniczyć w procesach zapalnych czy metastazie. Aktywacja płytek krwi odbywa się poprzez działanie różnych fizjologicznych aktywatorów, m.in. trombiny, kolagenu, ADP, tromboksanu A_2 (TXA_2) czy serotoniny, które przy udziale receptorów błonowych, białek G i kinaz tyrozynowych powodują odpowiedź komórek przejawiającą się zmianą kształtu, adhezją, agregacją czy sekrecją. W wewnątrzkomórkowej aktywacji płytek krwi ważną rolę odgrywają: szlak fosfoinozytolowy i kaskada kwasu arachidonowego. W szlaku fosfoinozytolowym z bifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2) pod wpływem fosfolipazy C powstaje diacyloglicerol (DAG) i trifosforan inozytolu (IP_3), które odgrywają istotną rolę w dalszej aktywacji płytek. IP_3 wpływa na mobilizację jonów Ca^{2+} z układu kanalików gęstych. W ten sposób IP_3 przyczynia się do aktywacji fosfolipazy A_2, a przez to do uwolnienia kwasu arachidonowego i uruchomienia jego przemiany do TXA_2. Z kolei DAG aktywuje kinazę białkową C, co prowadzi do fosforylacji białek, uwolnienia zawartości ze specyficznych płytkowych ziarnistości oraz do aktywacji receptora dla fibrynogenu – $\alpha_{IIb}\beta_3$. Płytki mają charakterystyczne α ziarnistości magazynujące cytokiny i białka o różnorodnych funkcjach oraz ziarnistości osmofilne o dużej gęstości elektronowej, w których zmagazynowane są liczne związki, m.in. ADP, ATP czy serotonina. W płytce krwi w cyklu przemian kwasu arachidonowego zainicjowanym przez cyklooksygenazę powstaje wewnętrzny aktywator płytek krwi – tromboksan A_2, a pod wpływem 12-lipoksygenazy hamujący agregację kwas 12-hydroksyeikoza-tetraenowy (12-HETE) [9, 32, 35, 63, 72, 73].

Reaktywne formy tlenu, w tym także powstające w samych płytkach, odgrywają istotną rolę w regulowaniu procesu ich aktywacji. Aktywacja płytek krwi może być wywołana przez niskie, fizjologiczne stężenia RFT wytwarzane przez leukocyty czy przez rodnik hemoglobiny pochodzący z erytrocytów [28]. Celem tej pracy jest opisanie dróg tworzenia RFT w płytkach krwi oraz ich roli w aktywacji.

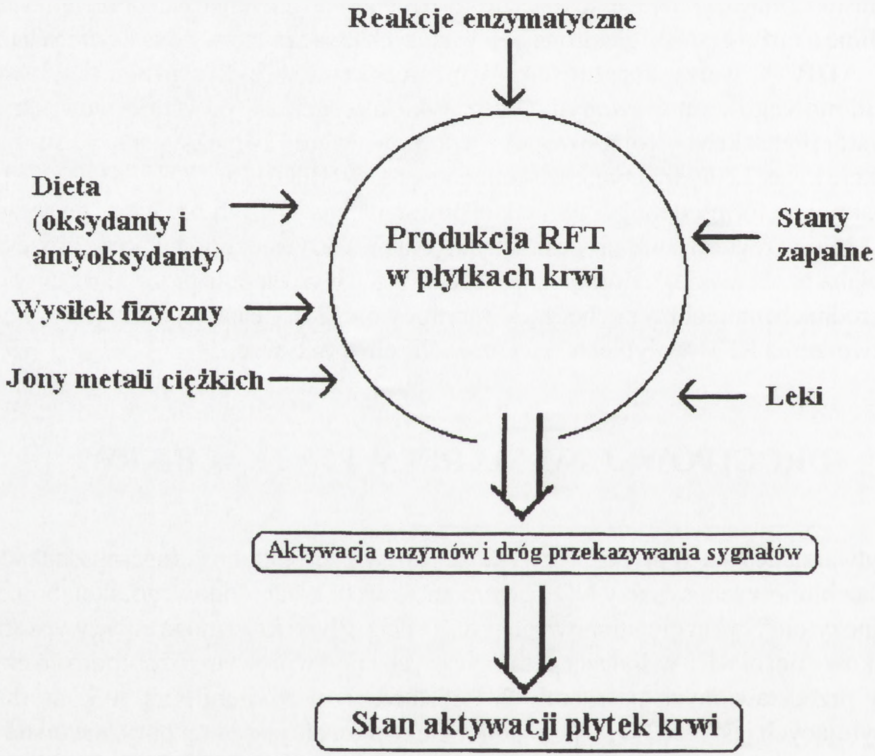
DROGI POWSTAWANIA RFT W PŁYTKACH KRWI

Wytwarzanie RFT w płytkach krwi może odbywać się kilkoma drogami: z udziałem oksydaz błonowych, syntazy $NO^{\cdot}$, przemiany kwasu arachidonowego, metabolizmu fosfoinozytolu i cyklu glutationowego (ryc. 1) [71]. Płytki krwi mogą także wytwarzać dodatkowe ilości RFT w stanach patologicznych i pod wpływem różnorodnych czynników przedstawionych na rycinie 2. Podstawowym źródłem RFT w komórkach fagocytujących jest NADPH – jako donor elektronu, ale jak do tej pory, nie udało się wyizolować oksydazy NADPH z płytek krwi. Badania Salvemini i wsp. [64] wykazały, że zastosowanie diphenyliodionium – niespecyficznego inhibitora oksydazy NADPH powoduje zahamowanie agregacji płytek krwi stymulowanej trombiną, ADP czy kolagenem. Finazzi-Agro i wsp. [18] natomiast stwierdzili, że w płytkach krwi obecna jest oksydaza NADPH z NADP jako kofaktorem. Inicjatorami badań nad

http://rcin.org.pl



RYCINA 1. Źródła reaktywnych form tlenu (RFT) w płytkach krwi



RYCINA 2. Modulowanie stanu aktywacji płytek krwi przez RFT powstające w płytkach krwi. W krwinkach płytkowych RFT mogą być produkowane w reakcjach enzymatycznych oraz ich wytwarzanie może być indukowane przez składniki diety pokarmowej, wysiłek fizyczny, jony metali ciężkich, stany zapalne czy leki

http://rcin.org.pl

powstawaniem RFT w płytkach krwi jest Marcus i wsp. [37], którzy stosując metodę kolorymetryczną opierającą się na redukcji cytochromu c stwierdzili, że płytki krwi produkują $O_2^{\cdot}$; reakcja ta hamowana była przez dysmutazę ponadtlenkową. Późniejsze badania [30] wykazały, że aktywacja płytek krwi jest powiązana ze wzrostem produkcji $O_2^{\cdot}$. Tworzenie $O_2^{\cdot}$ odbywa się w czasie metabolizmu arachidonianu w drodze zależnej od 12-lipoksygenazy czy cyklooksygenazy i przemiany glutationu [30]. Butionino-sulfoksyimina (BSO) – inhibitor syntetazy γ-glutamylocysteinowej obniża poziom glutationu w płytkach z jednoczesnym obniżeniem poziomu RFT w krwinkach płytkowych [53, 71]. Źródłem rodnika hydroksylowego z kolei może być przemiana prostaglandyn [38].

W płytkach krwi oprócz $O_2^{\cdot}$, czy $^{\cdot}OH$ powstają również inne reaktywne formy tlenu, w tym nadtlenek wodoru, co wykazano metodą fluorescencji przy użyciu m.in. 2,7-dichlorofluoresceiny. Udowodniono ponadto, że H_2O_2 powstający w stymulowanych trombiną płytkach krwi jest przekształcany do bardzo reaktywnej formy $^{\cdot}OH$ (w reakcji podobnej do reakcji Fentona) niezbędnej do wytwarzania agregatów płytkowych [29, 34, 74].

Aktywacja płytek krwi indukowana innym silnym agonistą – kolagenem (w przeciwieństwie do ADP) jest powiązana także z wytwarzaniem nadtlenku wodoru, funkcjonującego jako wtórny przekaźnik, który stymuluje metabolizm kwasu arachidonowego i aktywuje fosfolipazę C [16, 56]. Mechanizm aktywacji fosfolipazy C przez H_2O_2 nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. H_2O_2 odgrywa istotną rolę w aktywacji kinaz tyrozynowych, dzięki czemu pośrednio może wpływać na aktywność fosfolipazy C. Udział i znaczenie nadtlenku wodoru w aktywacji płytek krwi potwierdzono wykorzystując katalazę. Stwierdzono, że katalaza-enzym rozkładający nadtlenek wodoru w sposób zależny od dawki – hamuje uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błony płytkowej, syntezę eikozanoidów czy przemianę fosfoinozytoli. Wykazano także, że aktywacja płytek indukowana wysokimi dawkami kolagenu była hamowana w obecności różnych antyoksydantów (m. in. witamina E), co wskazuje, że H_2O_2 i inne reaktywne formy tlenu mogą uczestniczyć w aktywacji płytek krwi wywołanej kolagenem [16, 38, 56].

Płytki krwi są zdolne do wytwarzania tlenku azotu ($NO^{\cdot}$). Swierdzono, że $NO^{\cdot}$ powstaje w cytosolu płytek krwi w ilościach ~100 fmol $NO^{\cdot}$/mg białka płytek/min, tzn. ~1 pg $NO^{\cdot}$/mg białka płytek. W niepobudzonych płytkach krwi szybkość powstawania $NO^{\cdot}$ to ok. 4–7 pmol/min/10^8 płytek, natomiast ok. 11–21 pmol/min/10^8 płytek po aktywowaniu kolagenem [40, 75]. Płytki krwi mają dwie formy syntazy $NO^{\cdot}$: konstytutywną i indukowalną. Uważa się, że enzymy te pochodzą z jądrzastych megakariocytów, z których w wyniku sekwestracji powstają płytki krwi. W ludzkich megakariocytach (Meg-01), odkryto aktywność konstytutywnej i ekspresję indukowalnej syntazy tlenku azotu. Konstytutywna jest zależna od jonów Ca^{2+} i NADPH. Pobudzenie Meg-01 przez cytokiny IL1 β i TNF-α prowadzi do ekspresji indukowalnej formy, Ca^{2+} niezależnej [20, 33]. Ta aktywność wzrasta po dodaniu NADPH i tetra-hydrobiopteryny jako kofaktora. Substratem syntazy $NO^{\cdot}$ jest L-arginina, która ulega redukcji przy udziale NADPH, a z kolei z której po odłączeniu tlenku azotu powstaje

http://rcin.org.pl

cytrulina. Uwalnianie $NO^{\cdot}$ przez płytki krwi przypuszczalnie pełni rolę w ujemnym mechanizmie sprzężenia zwrotnego ochrony przed ich dalszą aktywacją [58, 59]. Sugeruje się, że w płytkach krwi obecny jest mRNA dla konstytutywnej syntazy tlenku azotu [5, 66]. Tlenek azotu jest wolnym rodnikiem mającym jeden elektron niesparowany, reaguje on z białkami, zwłaszcza zawierającymi centra żelazowo-siarkowe, jony metali przejściowych lub grupy hemowe (np. cyklaza guanylanowa). W obecności tlenu jest bardzo nietrwałą cząsteczką. W natlenionych roztworach wodnych jego okres półtrwania wynosi kilka sekund, gdyż $NO^{\cdot}$ reaguje z tlenem i powstaje wówczas dwutlenek azotu $NO^{\cdot}_2$ [4, 26, 36, 44, 60]. Aktywność biologiczna $NO^{\cdot}$ jest jednak limitowana przez szybką reakcję z $O_2^{\cdot-}$, w której powstaje nadtlenoazotyn ($ONOO^-$). $ONOO^-$ może być też źródłem rodnika hydroksylowego [3]. Mechanizm działania leków kardiolitycznych (np. nitrogliceryny czy azotanów organicznych) stosowanych jako środki rozszerzające naczynia krwionośne polega na dostarczaniu $NO^{\cdot}$ do krwioobiegu [4, 26, 36, 44, 60].

ROLA RFT W AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Aktywację płytek krwi zapoczątkowują agoniści, m.in. trombina, kolagen, tromboksan A_2, ADP czy jony Ca^{2+} wchodząc w interakcję ze swoistymi receptorami obecnymi na powierzchni błony płytkowej. W przebiegu aktywacji płytek dochodzi do gwałtownej zmiany ich kształtu z dyskoidalnego na kulisty z wytworzeniem wypustek zwiększających powierzchnię i ułatwiających ich wzajemny kontakt, co prowadzi do tworzenia agregatów płytkowych. Mechanizmy działania reaktywnych form tlenu na poziomie komórkowym, w tym w krwinkach płytkowych są złożone i nie są w pełni poznane. Nie wyjaśniono jeszcze, w jaki sposób RFT mogą modulować funkcje biologiczne płytek krwi (tab. 1) [1, 15, 16, 28, 29, 37]. Sugeruje się, że w procesie aktywacji płytek krwi indukowanym przez RFT może uczetniczyć kilka mechanizmów (ryc. 3). RFT mogą aktywować fosfolipazę A_2 – główny enzym katalizujący uwalnianie z fosfolipidów błonowych kwasu arachidonowego, który jest przekształcany do głównego aktywatora płytek krwi – TXA_2 [19, 27, 47]. Zastosowanie inhibitorów fosfolipazy A_2 powoduje też zahamowanie agregacji indukowanej RFT [19]. Fosfolipaza A_2 jest aktywowana przez jony Ca^{2+}, ale nie ma pewności, czy RFT są zdolne do indukowania wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w płytkach krwi. Do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w płytce krwi dochodzi podczas działania czynników wywołujących stres oksydacyjny [41]. Stymulacja aktywności fosfolipazy A_2 może odbywać się także z udziałem białkowych kinaz tyrozynowych (np. kinazy MAP) regulowanych przez RFT [27, 47]. Fosforylacja białkowych kinaz tyrozynowych może być regulowana przez układ wytwarzający RFT z udziałem NADPH [12]. RFT mogą także stymulować metabolizm kwasu arachidonowego na różnych drogach, m. in. przez wzrost aktywności cyklooksygenazy [19, 28]. Rodniki hydroksylowe są odpowiedzialne za hamowanie, jednej lub kilku dróg uwalniania kwasu arachidonowego z fosfolipidów błony płytkowej przez fosfolipazy [46].

http://rcin.org.pl

TABELA 1. Rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi

Cząsteczka	Symbol	Biologiczne funkcje	Literatura
Anionorodnik ponadtlenkowy	$O_2^{\cdot}$	indukowanie agregacji płytek oraz sekrecji serotoniny z ziarnistości o dużej gęstości elektronowej	[23]
Rodnik hydroksylowy	OH	stymulowanie płytek krwi	[28, 29]
Nadtlenek wodoru	H_2O_2	w dawkach 2–10 mM hamowanie agregacji płytek w niższych stężeniach wzmaga syntezę TXA_2 i wytwarzanie agregatów płytkowych	[1, 15, 16, 51]
Tlen singletowy	$^1O_2$	hamowanie agregacji płytek krwi	
Rodnik tlenku azotu	NO	hamowanie różnych etapów aktywacji płytek krwi, m.in. agregacji czy adhezji	[69] [17, 31]

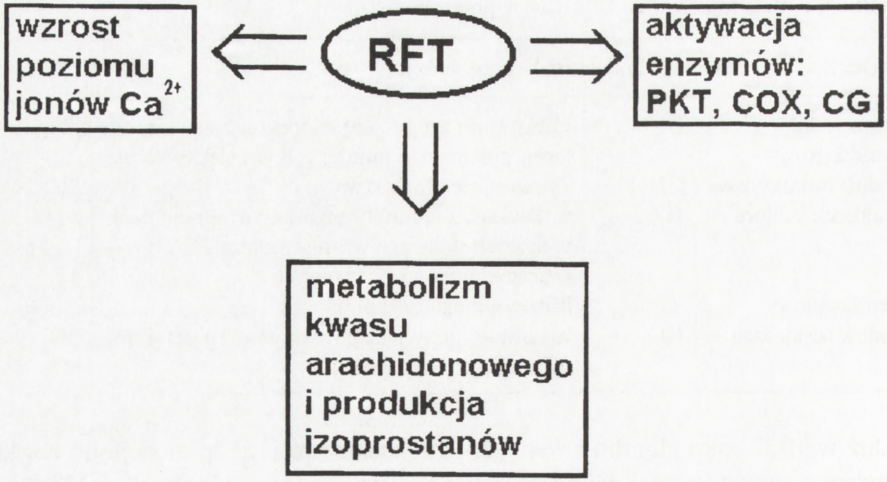
Już w 1977 roku Handin i wsp. [23] zaobserwowali, że inkubacja płytek krwi z układem enzymatycznym wytwarzającym $O_2^{\cdot}$, np. ksantyną lub oksydazą ksantynową, prowadzi do agregacji płytek krwi i wywołuje uwalnianie serotoniny. Rola H_2O_2 w aktywacji płytek krwi może być dwojaka. H_2O_2 może zarówno hamować, jak i stymulować funkcje biologiczne płytek krwi [15, 16]. Niskie dawki nadtlenku wodoru wzmagają syntezę tromboksanu A_2 przez stymulowanie cyklooksygenazy oraz potęgują agregację płytek krwi wywołaną trombiną [1]. Hamujący wpływ H_2O_2 na funkcje biologiczne płytek krwi był obserwowany jedynie przy wysokich dawkach H_2O_2, przypuszczalnie przez stymulowanie cyklazy guanylanowej i wzrost stężenia cGMP. Pod wpływem H_2O_2 w stężeniach od 2 do 10 mM dochodziło do zahamowania agregacji płytek krwi wywołanej ADP [51]. Wysokie stężenia mogą uszkadzać strukturę błony płytkowej, a tym samym receptory obecne w błonie, co może powodować zakłócenia przekazywania sygnałów do komórki. Nadtlenek wodoru hamuje fosfatazy tyrozynowe i ma wpływ na fosforylację białek [25]. Przypuszczalnie H_2O_2 też wpływa na metabolizm fosfoinozytoli przez zmianę aktywności fosfolipazy C [24].

Za aktywację płytek krwi podczas ekspozycji komórek na H_2O_2 są odpowiedzialne powstające z H_2O_2 rodniki hydroksylowe [29]. Aktywacja płytek krwi wywołana przez $^{\cdot}OH$ jest powiązana z uwalnianiem kwasu arachidonowego i blokowana przez inhibitory fosfolipazy A_2, np. mepakrynę, ale nie przez neomycynę czy staurosporynę (inhibitor białkowej kinazy C), co wskazuje, że fosfolipaza C i białkowa kinaza C nie uczestniczą w pierwszej fazie aktywacji płytek krwi wywołanej $^{\cdot}OH$ [28, 29]. Istnieją jednak doniesienia, że białkowa kinaza C bierze udział także w tym procesie [57].

Tlen singletowy w dawkach fizjologicznych (~1 mM) jest uważany za czynnik antypłytkowy, gdyż hamuje agregację płytek krwi. Inaktywuje też osoczowe czynniki krzepnięcia. Nie wyklucza się, że może on częściowo współdziałać z $NO^{\cdot}$. Głównym receptorem dla tlenu singletowego może być metionina, grupa tiolowa cysteiny czy wiązania podwójnego (jak w retinoidach, nienasyconych kwasach tłuszczowych czy cholesterolu) [69].

W płytkach krwi bezpośrednio pod wpływem wolnych rodników kwas arachidonowy wbudowany estrowo do fosfolipidów błony komórkowej może ulegać utlenieniu. W wyniku tego nieenzymatycznego utleniania mogą powstawać liczne izoprostany –

http://rcin.org.pl



RYCINA 3. Funkcje reaktywnych form tlenu (RFT) w płytkach krwi. W krwinkach płytkowych RFT powodują szereg zmian biochemicznych, m.in. wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, produkcję izoprostanów oraz aktywację różnych enzymów (białkowych kinaz tyrozynowych (PKT), cyklooksygenazy (COX) i cyklazy guanylanowej (CG)), dalsze objaśnienia w tekście

izomery prostaglandyn. W 1967 roku po raz pierwszy Nugteren i Pryor zaobserwowali, że prostaglandynopodobne związki zawierające pierścień cyklopentanowy powstają *in vitro* jako produkty autoperoksydacji wielonienasyconych, dwudziestowęglowych kwasów tłuszczowych. Wówczas nie przypuszczano, że możliwa jest droga syntezy tych związków *in vivo*. Obecnie wiadomo, że izoprostany powstają *in vivo* bez udziału cyklooksygenazy. Są wbudowane w fosfolipidy błony komórkowej i z nich uwalniane pod wpływem fosfolipaz (głównie fosfolipazy A_2) przechodzą do osocza, a następnie są wydalane z moczem. Poziom izoprostanów w osoczu, a przede wszystkim w moczu, może odzwierciedlać stopień peroksydacji lipidów, m.in. w procesie starzenia, w zatruciach i w różnorodnych stanach patologicznych wywołanych działaniem wolnych rodników, a także może być bezinwazyjnym markerem stopnia aktywacji płytek krwi *in vivo* [13, 45, 48, 61, 80].

W ciągu ostatnich lat stwierdzono, że rodnik tlenku azotu produkowany głównie przez komórki śródbłonka po wniknięciu do wnętrza płytki krwi stymuluje cyklazę guanylanową prowadząc do wzrostu stężenia cGMP i hamowania uwalniania jonów wapnia do cytosolu. Wiele procesów wewnątrzpłytkowych jest uzależnionych od stężenia jonów wapnia. Głównymi procesami zachodzącymi przy udziale Ca^{2+} są: regulacja aktywności kinaz i innych enzymów oraz przejście G-aktyny w F-aktynę. Jony wapnia napływające do cytoplazmy płytkowej podczas aktywacji płytek krwi pochodzą z dwóch źródeł: z osocza i zasobów wewnątrzpłytkowych zmagazynowanych w układach tubuli. W związku z dużą różnicą stężeń jonów wapnia w osoczu (około 1 mM) i cytoplazmie (około 100 nM w płytkach krwi w stanie spoczynkowym) następuje

http://rcin.org.pl

stałe ich przeciekanie przez błonę płytkową. Zbytniemu wzrostowi stężenia tych jonów w cytoplazmie przeciwdziała system ich usuwania, zawierający pompę wapniową (Ca^{2+}-ATP-aza) i wymieniacz wapniowy (Na^{+}-Ca^{2+}). Nadmiar jonów wapnia jest także wychwytywany i magazynowany w układzie tubuli [9, 32, 35, 63]. Rodnik tlenku azotu obniżając stężenie jonów wapnia w cytoplazmie prowadzi do zahamowania różnych etapów aktywacji płytek krwi, m. in. tworzenia agregatów płytkowych i adhezji płytek krwi do włókien kolagenu [17, 31].

Wpływ nadtlenoazotynu powstającego w reakcji $O_2^{\cdot-}$ z $NO^{\cdot}$ na właściwości biologiczne płytek krwi nie jest także w pełni poznany, a nieliczne doniesienia są często kontrowersyjne [11, 42, 43, 49, 50]. Ekspozycja płytek krwi na działanie nadtlenoazotynu powoduje nitrowanie reszt tyrozynowych białek płytkowych i zmienia ich funkcje [49, 50]. Obecność osocza całkowicie hamuje ten efekt, osłabiając jednocześnie proces agregacji wywołany kolagenem [10, 11, 42, 43]. Hemoglobina w ilościach nanomolowych uwalniana z uszkodzonych erytrocytów może indukować aktywację płytek krwi. Molekularny mechanizm tego procesu opierający się również na wytwarzaniu RFT wymaga jeszcze wyjaśnienia.

UWAGI KOŃCOWE

W wyniku nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu powstają liczne, zarówno ostre jak i przewlekłe, schorzenia u ludzi. Główne schorzenia związane z wytwarzaniem i z działaniem RFT to: choroby układu krążenia, choroby nowotworowe, cukrzyca, choroby ośrodkowego układu nerwowego (choroba Parkinsona, Alzheimera, stwardnienie rozsiane), choroby układu pokarmowego, krwinek czerwonych, AIDS, wstrząs septyczny, a nawet grypa. Istnienie zależności między wytwarzaniem RFT a zmianami funkcji płytek krwi może być również przyczyną chorób układu krążenia. Dobroczynną rolę w profilaktyce chorób układu krążenia może spełniać dieta wzbogacona o produkty pochodzenia roślinnego. Owoce i warzywa są cennym źródłem wielu substancji odżywczych o własnościach antyoksydacyjnych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Można tu wymienić „klasyczne" witaminy A, C, E oraz związki o charakterze polifenoli [6, 7, 8, 14, 21, 22, 39, 52, 62, 67, 68]. Związki te nie tylko usuwają istniejące RFT, ale i ograniczają tworzenie się nowych. Niektóre z tych antyoksydantów mogą hamować aktywację krwinek płytkowych i ograniczać występowanie chorób układu sercowo-naczyniowego [52, 54, 55, 76, 77]. Do takich związków należy resweratrol występujący w znacznych ilościach w winie czerwonym [6, 7, 21, 52, 54, 77]. Ostateczny wpływ RFT na funkcje płytek krwi, mechanizmy ich powstawania w krwinkach płytkowych oraz rola RFT w chorobach układu krążenia wymagają dalszych badań.

http://rcin.org.pl

PIŚMNIENNICTWO

[1] AMBROSIO G, GOLINO P, PASCUCCI I, ROSOLOWSKY M, CAMBELL WB, DECLERK F, TRITTO I, CHIARIELLO M. Modulation of platelet function by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1994; **267**: 308–318.

[2] BARTOSZ G. Co to są reaktywne formy tlenu. *Druga twarz tlenu*. Wyd. Naukowe PWN, W-wa 1995: 17–28.

[3] BARTOSZ G. Peroxynitrite: Mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Bioch Pol* 1996; **43**: 645–658.

[4] BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHAL PA, FREEMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; **87**: 1620–1624.

[5] BERKELS R, BERTSCH BA, ZUTHER T, DHEIN S, STOCKKLAUSER K, ROSEN P. Evidence for a NO synthase in porcine platelets which is stimulated during activation/aggregation. *Eur J Haematol* 1997; **58**: 307–313.

[6] BERTELLI AA, GIOVANNINI L, BERNINI W, MIGLIORI M, FREGONI M, BAVERESCO L, BERTELLI A. Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exp Clin Res* 1996; **22**: 61–63.

[7] BERTELLI AA, GIOVANNINI L, GIANNESSI DZ, MIGLIORI M, BERNINI W, FREGONI M, BERTELLI A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* 1995; **17**: 1–3.

[8] BLACHE D, GESQUIERE L, LOREAU N, DURAND P. Oxidant stress: the role of nutrients in cell-lipoprotein interactions. *Proc Nutrit Soc* 1999; **58**: 559–563.

[9] BLOCKMANS D, DECKMYN H, VERMYLEN J. Platelet activation. *Blood Rev* 1995; **9**: 143–156.

[10] BROWN AS, MORO MA, MASSE MJ, CRAMER EM, RADOMSKI M, DARLEY-USMAR V. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 1998; **40**: 380–388.

[11] BRUCKDORFER KR. The nitration of proteins in platelets. *Life Sci* 2001; **324**: 611–615.

[12] CHAO TS, BYRON KL, LEE KM, VILLEREAL M, ROSNER MR. Activation of MAP kinases by calcium dependent and calcium independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 19876–19883.

[13] CRACOWSKI JL, DEVILLER P, DURAND T. Vascular biology of the isoprostanes. *J Vasc Res* 2001; **38**: 93–103.

[14] DANIEL O, MEIER MS, SCHLATTER J, FRISCHHNECHT P. Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ Health Perspect* 1999; **107**: 109–114.

[15] DEL PRINCIPE D, MENICHELLI A, DE MATTEIS W, DI CORPO ML, DI GIULIO S, FINAZZI-AGRO AF. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Let* 1985; **1**:142–149.

[16] DEL PRINCIPE D., MENICHELLI A, DE MATTEIS W, DI GIULIO S, GIORDANI M, SAVINI I, FINAZZI AGRO AF. Hydrogen peroxide is an intermediate in the platelet activation cascade triggered by collagen, but not by thrombin. *Thromb Res* 1991; **62**: 365–371.

[17] DRAIJER R, ATSMA DE, VON DER LAARSE A, VON HINSBERGH VWM. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. *Circul Res* 1995; **76**: 1992–2008.

[18] FINAZZI-AGRO A, MENICHELLI A, PERSIANI M, BIANCINI G, DEL PRINCIPE D. Hydrogen peroxide release from human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982; **718**: 21–25.

[19] FORDE RC, FITZGERALD DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 1997; **95**: 787–789.

[20] FORSTERMANN U, GATH I, SCHWARZ P, CLOSS EI, KLEINERT H. Isoform of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 1995; **50**: 1321–1332.

[21] FREMONT L, BELGUENDOUZ L, DELPAL S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* 1999; **64**: 2511–2521.

[22] FREMONT L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000; **66**: 663–673.

[23] HANDIN RI, KARABIN R, BOXER GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest* 1977; **59**: 959–965.

[24] HEDIN HLM, FOWLER CJ. Further studies of the effects of diamide and hydrogen peroxide on calcium signaling in the human platelet. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 1999; **21**: 321–325.

http://rcin.org.pl

[25] HERNANDEZ-HERNANDEZ A, ANCHEZ-YAGUE J, MARTIN-VALMASEDA EM, LLIANILLO M. Oxidative inactivation of human and sheep platelet membrane-associated phosphotyrosine phosphatase activity. *Free Rad Biol Med* 1999; **26**: 1218–1230.
[26] HUIE RE, PADMAJA S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; **18**: 195–199.
[27] IRANI K, PHAM Y, COLEMAN LD, ROOS CH, COOKE GE, MIODOVNIK A, KARIM N, WILHIDE CC, BRAY PF, GOLDSCHMIDT-CLEMONT PJ. Priming of platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of β_3. *Arter Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1698–1706.
[28] IULIANO L, COLAVITA AR, LEO R, PRACTICO D, VIOLI F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Rad Biol Med* 1997; **22**: 999–1006.
[29] IULIANO L, PEDERSEN JZ, PRACTICO D, ROTILIO G, VIOLI F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 695–704.
[30] JAHN B, HANSCH GM. Oxygen radical generation in human platelets: dependence of 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; **93**: 73–79.
[31] KREJCY K, SCHMETTERER L, KASTNER J, NIESZPAUR-LOS M, MONITZER B, SCHUTZ W, EICHLER HG, KURLE PA. Role of nitric oxide in hemostatic system activation *in vivo* in humans. *Arter Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 2063–2067.
[32] KROLL MH, SCHAFER AJ. The analysis of ligand-receptor interaction in platelet activation. *Immunopharmacol* 1995; **29**: 31–65.
[33] LELCHUK R., RADOMSKI MW, MARTIN JM, MONCADA S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase in human megakaryoblastic cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **262**: 1220–1224.
[34] LEO R, GHISELLI A, IULIANO L, VIOLI F. Role of hydroxyl radicals by the salicylate bis-hydroxylation during arachidonic acid-dependent platelet activation. *Thromb Haemostas* 1995; **73**: A347.
[35] LEVY-TOLEDANO S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a hierarchy? *Haemostas* 1999; **29**: 4–15.
[36] LIN P, HOCK CE, NAGELE R, WONG PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997; **275**: U2327–2336.
[37] MARCUS AJ, SILK ST, SAFIER LB, ULLMANN HL. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest* 1977; **59**: 149–158.
[38] MARESCA M, COLAO C, LEONCINI G. Generation of hydrogen peroxide in resting and activated platelets. *Cell Biochem Function* 1992; **10**: 79–82.
[39] MARTINEZ J, MORENO JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**: 865–870.
[40] MEHTA JL, CHEN LY, KONE BC, MEHTA P, TURNER P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med Med* 1995; **125**: 370–377.
[41] MIRABELLI F, SALIS A, VAIRETTI M, BELLOMO G, THOR H, ORRENIUS S. Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca^{2+} dependent mechanism. *Arch Biochem Biophys* 1989; **270**: 478–488.
[42] MONDORO TH, SHAFER BC, VOSTAL JG. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. *Free Rad Biol Med* 1997; **22**: 1055–1063.
[43] MORO MA, DARLEY-USMAR VM, GOODWIN DA, READ NG, ZAMORA-PINO R, FEELISCH M, RADOMSKI MW, MONCADA S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6702–6706.
[44] MORO MA, DARLEY-USMAR VM, LIZASOAIN I, SU Y, RADOMSKI WM, MONCADA S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol* 1995; **116**: 1999–2004.
[45] MORROW JD, HILL KE, BURK RF, NAMMOUR TM, BADR KF, ROBERTS LJ. A series of prostaglandin F_2-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9383–9387.
[46] MULLER M, SORREL TC. Oxidative stress and the mobilisation of arachidonic acid in stimulated human platelets: role of hydroxyl radical. *Prostaglandins* 1997; **54**: 493–509.
[47] NAGAI K., INAZU T, YAMAMURA H. P72syk is activated by vanadate plus H_2O_2 in porcine platelets and phosphorylates GTPase activating protein on tyrosine residue(s). *J Biochem* 1994; **116**: 1176–1181.
[48] NOUROOZ-ZADEH J, HALLIWELL B, ANGGARD EE. Evidence for the formation of F_3-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **236**: 467–472.

http://rcin.org.pl

[49] NOWAK P, WACHOWICZ B. Studies on pig platelet responses to peroxynitrite action. *Platelets* 2001; **12**: 376–381.
[50] NOWAK P, WACHOWICZ B. The effects of peroxynitrite on pig platelet lipid peroxidation and the secretory process induced by thrombin. *Cytobios* 2001; **106**: 179–187.
[51] OHYASHIKI T, KOBAYASHI M, MATSUI K. Oxygen-radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys* 1991; **288**: 282–286.
[52] OLAS B, ŻBIKOWSKA HM, WACHOWICZ B, KRAJEWSKI T, BUCZYŃSKI A, MAGNUSZEWSKA A. Inhibitory effect of resveratrol on free radical generation in blood platelets. *Acta Biochim Pol* 1999; **46**: 991–996.
[53] OLAS B., WACHOWICZ B. Modulation of cisplatin toxicity in blood platelets by glutathione depletion. *Anti-Cancer Drugs* 1998; **9**: 473–478.
[54] OLAS B, WACHOWICZ B, SZEWCZUK J, SALUK-JUSZCZAK J, KACA W. The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. *Microbios* 2001; **105**: 7–13.
[55] OLAS B, WACHOWICZ B, SALUK-JUSZCZAK J, ZIELIŃSKI T, KACA W, BUCZYNSKI A. Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin-stimulated blood platelets. *Cell Biol Toxicol* 2001; **17**: 117–125.
[56] PIGNATELLI P, PULCINELLI FM, PULCINELLI FM, LENTI L, GAZZANIGA PP, VIOLI F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998; **91**: 484–490.
[57] PRACTICO D, PASIN M, BARRY OP, GHISELLI A, SABATINO G, IULIANO L, FITZGERALD GA, VIOLI F. Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation* 1999; **99**: 118–124.
[58] RADOMSKI MW, PAMER RM, MONCADA S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990; **101**: 325–328.
[59] RADOMSKI MW, PAMER RM, MONCADA S. An L-arinine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5193–5197.
[60] RADOMSKI MW, SALES E. Nitric oxide: biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atheriosclerosis. *Atheriosclerosis* 1995; **118**: S69–80.
[61] REILLY MP, DELANTY N, ROY L, ROKACH J, CALAGHAN PO, CREAN P, LAWSON JA, FITZGERALD GA. Increased formation of the isoprostanes $IPF_{2\alpha}$-I and 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$ in acute coronary angioplasty: evidence for oxidant stress during coronary reperfusion in humans. *Circulation* 1997; **96**: 3314–3320.
[62] ROTONDO S, ROTILIO D, CERLETTI CH, DE GAETANO G. Red wine, aspirin and platelet function. *Thromb Haemostas* 1996; **76**: 813–821.
[63] RYNINGEN A., HOLMSEN H. In "Platelet Physiology and Pharmacology" (Gundu H. and Rao R. eds.) Kluwer Academic Publishers, Norwell, 1999, 1–22
[64] SALVEMINI D, RADZISZEWSKI W, MOLLACE V, MOORE A, WILLOUGHBY D, VANE J. Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* 1991; **199**: 15–18.
[65] SALVEMINI D, BOTTING R. Modulation of platelet function by free radicals and free radicals scavengers. *TIPS* 1993; **14**: 36–42.
[66] SASE K, MICHEL T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 1995; **57**: 2049–2055.
[67] SCHOENE NW, GUIDRY CA. Genistein inhibits reactive oxygen species (ROS) production, shape change, and aggregation in rat platelets. *Nutr Res* 2000; **20**: 47–57.
[68] SCHOENE NW, GUIDRY CA. Dietary soy isoflavones inhibit activation of rat platelets. *J Nutr Biochem* 1999; **10**: 421–426.
[69] STIEF TW, KURZ J, DOSS MO, FAREED J. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res* 2000; **97**: 473–480.
[70] TABER DF, MORROW JD, ROBERT II LJ. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* 1997; **53**: 63–67.
[71] WACHOWICZ B, OLAS B, ŻBIKOWSKA HM, BUCZYŃSKI A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; **13**: 175–182
[72] WHITE GC. Platelet physiology and function. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2000, **11**: 53.
[73]WU K. Platelet activation mechanisms and marker in arterial thrombosis. *J Intern Medicine* 1996; **239**: 17–34.

http://rcin.org.pl

[74] VIOLI F, GHISELLI A, IULIANO L, ALESSANDRI C, CORDOVA C, BALSANO F. Influence of hydroxyl radical scavengers on platelet function. *Haemostasis* 1988; **18**: 91–98.
[75] ZHOU Q, HELLERMAN GR, SOLOMONSON LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res* 1995; **77:** 87–96.
[76] ŻBIKOWSKA HM, OLAS B, WACHOWICZ B, KRAJEWSKI T. Response of blood platelets to resveratrol. *Platelets* 1999; **10**: 251–256.
[77] ŻBIKOWSKA HM, OLAS B. Antioxidants with carcinostatic activity (resveratrol, vitamin E and selenium) in modulation of blood platelet adhesion. *J Physiol Pharmacol* 2000; **3**: 513–520.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 16.10.2002 r.
Przyjęto: 17.12. 2002 r.
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: olasb@biol.uni.lodz.pl

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (339–358)

WYCISZANIE GENÓW JAKO STRATEGIA BADANIA ICH FUNKCJI W ROŚLINACH

GENE SILENCING AS A STRATEGY FOR ANALYSIS OF GENE FUNCTION IN PLANTS

Anita WIŚNIEWSKA, Marcin FILIPECKI

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Streszczenie: Jedną z metod ustalania funkcji genów jest morfologiczna, cytologiczna i molekularna analiza porównawcza fenotypów roślin uzyskanych po wprowadzeniu konstrukcji genowej wywołującej wyciszenie genu albo jego nadekspresję. W niniejszym opracowaniu dokonano przeglądu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego wyciszania genów z uwzględnieniem jego przydatności do badania funkcji genów. Omówiono kolejno: rodzaje wyciszania (wyciszanie genów na poziomie transkrypcji, potranskrypcyjne wyciszanie genów, kosupresja, wyciszanie genów zależne od homologii, interferencja RNA, tłumienie), ich genetyczne uwarunkowania oraz przytoczono przykłady najczęściej używanych wektorów wyciszających w genomice funkcjonalnej roślin.

Słowa kluczowe: wyciszanie genów, potranskrypcyjne wyciszanie genów (PTGS), wyciszanie z udziałem RNA, wektory wyciszające.

Summary: One of the strategies for identification of gene function is the comparative morphological, cytological and molecular analysis of phenotypes obtained after introduction of the gene construct causing gene silencing or its overexpression. This paper describes some aspects of the gene silencing (transcriptional gene silencing, posttranscriptional gene silencing, co-suppression, homology dependent gene silencing, RNA interference, quelling), its application as a strategy for analysis of gene function and also the examples of plant silencing vectors.

Key words: gene silencing, posttranscriptional gene silencing (PTGS), RNA silencing, silencing vectors.

http://rcin.org.pl

I. WSTĘP

W ciągu ostatnich kilkunastu lat wyciszanie genów (ang. *gene silencing*) było często poruszanym tematem w literaturze dotyczącej transformacji roślin, która miała na celu uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji transgenu [38, 47] oraz w badaniach nad naturalnie występującą odpornością roślin na wirusy [60]. Temat ten również wzbudził ogromne zainteresowanie wśród naukowców ze względu na możliwość szerokiego wykorzystania wyciszania genów w uzyskiwaniu nowych fenotypów roślin przez zahamowanie ekspresji niepożądanych genów bez konieczności stosowania mutagenezy. Szybki rozwój genomiki pozwolił na uzyskanie w wielu laboratoriach puli genów, których rola w procesach życiowych może być badana przy zastosowaniu wysoce wydajnych metod z wykorzystaniem wyciszających wektorów plazmidowych [65] lub wirusowych [10]. W ciągu dwóch ostatnich lat ukazało się także wiele publikacji wyjaśniających genetyczny mechanizm wyciszania genów [18, 32, 44, 45, 65]. W niniejszej pracy skupiono się nad genetycznymi aspektami potranskrypcyjnego wyciszania genów oraz nad możliwościami praktycznego wykorzystania tego zjawiska u roślin na podstawie najnowszych osiągnięć naukowych. W szczególności położono nacisk na zastosowanie strategii wyciszania genów, przedstawiając zalety i wady różnych systemów, pozwalających na ukierunkowaną, wysoce specyficzną degradację cząsteczek informacyjnego RNA. Wprowadzenie do organizmu odpowiednich konstrukcji genowych, powodujących inaktywację docelowego genu endogennego prowadzi do zmian fenotypowych wywołanych jego dysfunkcją, a to umożliwia określenie przypuszczalnej roli kodowanego przez niego białka.

II. WYCISZANIE GENÓW

Wyciszanie genów polega na inaktywacji ich ekspresji i może dotyczyć nie tylko transgenów, ale także genów endogennych i wirusowych oraz transpozonów. Inaktywacja ta może zachodzić na poziomie transkrypcji (ang. *transcriptional gene silencing*, TGS) lub potranskrypcyjnym (ang. *post-transcriptional gene silencing*, PTGS). Uważa się, że wyciszanie genów jest naturalną odpowiedzią komórki roślinnej lub zwierzęcej na atak wirusów, transpozycję bądź rearanżację DNA. O wyciszaniu genów może decydować: rejon genomu, w którym nastąpiła insercja genu, liczba i ułożenie wbudowanych kopii genu, zmiany w sekwencji wprowadzonego genu, oddziaływania DNA-DNA i DNA-RNA oraz metylacja DNA.

Wyciszanie genów na poziomie transkrypcji jest efektem zmniejszenia wydajności syntezy RNA lub całkowitego zahamowania transkrypcji. Wpływ na TGS mogą mieć: miejsce w chromosomie, do którego nastąpiła insercja, oddziaływania homologicznych sekwencji DNA, metylacja DNA.

http://rcin.org.pl

Mechanizm potranskrypcyjnego wyciszania genów prowadzi do degradacji specyficznych, homologicznych sekwencji RNA w cytoplazmie. W efekcie zmniejsza się ilość mRNA transgenu, a także każdego RNA, który jest do niego homologiczny. Mechanizm PTGS został dobrze poznany w wyniku badań nad odpornością roślin transgenicznych na RNA wirusy, gdzie degradacja RNA wirusowego zależała od istnienia homologii pomiędzy sekwencją transgenu a sekwencją wirusa [40].

Jeżeli transgen zawiera sekwencje homologiczne do genu endogennego, to może zostać uruchomiony mechanizm inaktywujący zarówno transgen, jak i jego endogenny homolog. Zjawisko to zostało nazwane kosupresją (ang. *co-suppression*).

Kosupresja została po raz pierwszy zaobserwowana podczas próby uzyskania nadekspresji genu, kodującego syntazę chalkonową (CHS) biorącą udział w biosyntezie barwników kwiatów u petunii [56]. U kilku procent transformantów uzyskano nieoczekiwanie kwiaty białe lub biało-czerwone zamiast czerwonych. Te ostatnie powinny być efektem nadekspresji genu CHS. Nieoczekiwane fenotypy były wynikiem wyciszenia potranskrypcyjnego transgenu oraz genu endogennego syntazy chalkonowej.

III. CZYNNIKI WARUNKUJĄCE WYCISZANIE GENÓW

A. Miejsce wbudowania się transgenu

Poziom ekspresji transgenu może zależeć od regionu w genomie, w którym nastąpiła insercja. Wpływ, jaki wywiera organizacja strukturalna sekwencji DNA otaczającej transgen na poziom jego ekspresji, określono jako efekt pozycji (ang. *position effect*) [55]. Insercja transgenu w rejonie euchromatyny (aktywnym transkrypcyjnie) powinna sprzyjać ekspresji. Natomiast rejony heterochromatyny lub obszary zawierające sekwencje powtarzające się zwykle nie sprzyjają ekspresji transgenu. Ponadto bliskość sekwencji regulatorowych genów gospodarza, takich jak: promotory, enhancery, może mieć wpływ na poziom ekspresji transgenu.

B. Liczba kopii transgenu

Obecnie nie można jednoznacznie określić, czy i jaka korelacja występuje pomiędzy liczbą wbudowanych kopii transgenu a poziomem jego ekspresji. Włączenie do genomu wielu kopii transgenu może powodować zarówno podwyższenie, jak i obniżenie aktywności transkrypcyjnej transgenu [56]. Sytuację, gdzie zwiększona liczba kopii, zarówno w pojedynczym *locus* jak i w wielu *loci*, powoduje obniżenie aktywności transkrypcyjnej określono jako wyciszanie genów indukowane powtórzeniem (ang. *repeat induced gene silencing, RIGS*). Prawdopodobnie polega ono na przejściowym lub trwałym oddziaływaniu homologicznych sekwencji DNA, co prowadzi do ich inaktywacji [56].

http://rcin.org.pl

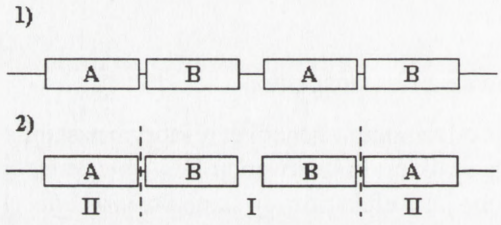
C. Konfiguracja wbudowanych kopii transgenu

Wbudowanie dwóch kopii do jednego *locus* w chromosomie może nastąpić w dwojaki sposób:

(1) „głowa do ogona" (ang. *head-to-tail*), inaczej proste powtórzenie (ang. *direct repeat*, DR lub *tandem repeat*);

(2) „głowa do głowy" (ang. *head-to-head*) lub „ogon do ogona" (ang. *tail-to-tail*), czyli tzw. odwrócone powtórzenie (ang. *inverted repeat*, IR) [55, 56]. W tym przypadku za kopię transgenu przyjęto całą konstrukcję genową, w której mogą występować różne sekwencje kodujące i regulatorowe.

Kopie transgenu wbudowane do genomu w konfiguracji IR lub DR częściej podlegają wyciszaniu niż kopie pojedyncze [55]. Ponadto wykazano, że sekwencje DNA ułożone jako „proste powtórzenia" rzadziej wykazują obniżoną ekspresję niż sekwencje ułożone jako „odwrócone powtórzenia". Analiza stopnia wyciszenia transgenu, którego kopie były ułożone w konfiguracji IR, wykazało, że stopień wyciszenia każdego rejonu kopii transgenu jest odmienny. Sekwencje znajdujące się na końcach położonych blisko siebie (w środkowej części IR) ulegały wyciszeniu częściej niż sekwencje na końcach zewnętrznych (ryc. 1).



RYCINA 1. Schemat ilustrujący proste (1) i odwrócone (2) powtórzenie dwóch kopii transgenu w pojedynczym *locus*. A, B – sekwencje (geny) A i B. I, II – część środkowa i zewnętrzna układu IR. Sekwencje B, znajdujące się na dwóch oddzielnych kopiach, tworzą część środkową układu IR i ulegają częściej wyciszeniu niż sekwencje A

D. Metylacja DNA

Stan metylacji danego regionu w genomie, w którym nastąpiła insercja, ma znaczący wpływ na stabilność ekspresji zarówno transgenu, jak i znajdujących się tam genów. Wyróżnia się dwa rodzaje metylacji DNA:

(1) metylacja zachowawcza – po replikacji DNA jest przywracany schemat metylacji DNA rodzicielskiego w DNA potomnym;

(2) metylacja *de novo* – metylowanie uprzednio niemetylowanych sekwencji i wprowadzanie w ten sposób nowego wzoru metylacji.

Metylacja DNA u roślin zachodzi głównie w sekwencjach -CpG- (82%) oraz -CpXpG- (>80%). Metylacja *de novo*, często związana z wyciszaniem transgenów u roślin, nie jest jedynie ograniczona do reszty cytozyny położonej w wyżej wymienionych motywach symetrycznych [56].

http://rcin.org.pl

Jeżeli insercja transgenu nastąpiła w rejonie hiperzmetylowanym, to ten wzór metylacji może pokryć wprowadzoną sekwencję i spowodować redukcję albo całkowite zahamowanie aktywności transkrypcyjnej transgenu. Obserwowano również specyficzną metylację transgenu po jego wbudowaniu w obszar niemetylowany, podczas gdy sekwencje sąsiadujące pozostawały niezmienione. Prawdopodobnie komórki roślinne dysponują mechanizmem rozpoznawania transgenów i ich inaktywacji [56].

U roślin transgenicznych wykazujących obniżoną ekspresję wprowadzonego genu obserwowano wzrost poziomu metylacji promotora i/lub sekwencji kodującej [56]. To, czy zmniejszenie ekspresji bądź całkowita inaktywacja transgenu są spowodowane wzrostem poziomu metylacji, może być stosunkowo łatwo sprawdzone przez dodanie do pożywki roślinnej czynnika demetylującego, którym jest 5-azacytydyna (5-azaC). Wbudowanie 5-azacytydyny w miejsce cytydyny uniemożliwia metylację DNA (5-azaC, zawiera atom azotu w pozycji 5', zamiast atomu węgla). Podanie tego związku w pożywce roślinnej może prowadzić do przejścia danego obszaru genomowego ze stanu zmetylowanego do niezmetylowanego (do braku możliwości metylacji) i co za tym idzie do reaktywacji genów [56].

Wzrost liczby zmetylowanych reszt cytozynowych w promotorze może być konsekwencją oddziaływań homologicznych sekwencji DNA w obszarze promotora, jak również oddziaływań DNA-RNA podczas metylacji DNA zależnej od RNA (ang. *RNA-directed DNA methylation*, RdDM). RdDM *de novo* w obszarze promotora powoduje wyciszenie na poziomie transkrypcji, które jest dziedziczone, a za utrzymanie wzoru metylacji w tym przypadku odpowiada transferaza metylowa Met1 [32]. RdDM jest jedną z form odpowiedzi organizmu na obce DNA i po raz pierwszy stwierdzono ją u tytoniu po transformacji cDNA wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd). Specyficzna metylacja cDNA wiroidowego pojawiła się po inokulacji roślin PSTVd. Metylacja ta była prawdopodobnie skutkiem wysokiej aktywności transkrypcyjnej, wskutek której doszło do nadprodukcji transkryptu, co prowadziło z kolei do oddziaływań pomiędzy homologicznymi sekwencjami RNA-DNA i inicjacji metylacji *de novo*. Sugeruje to, że sekwencje RNA mogą indukować metylację *de novo* homologicznych sekwencji DNA [56]. RdDM transgenów może być także wywoływana przez RNA wirusy [23, 29, 31, 59] oraz pojawiać się w przypadku *locus*, zawierającego odwrócone powtórzenia transgenu [43].

E. Oddziaływania homologicznych sekwencji kwasów nukleinowych

Oddziaływania pomiędzy sekwencjami kwasów nukleinowych (DNA-DNA i RNA-RNA) mogą zachodzić w przypadku, gdy wykazują one wysoki stopień homologii. Aby doszło do takich oddziaływań, chromatyna musi być rozluźniona, co ma miejsce na przykład podczas wiązania się białek regulatorowych z nicią DNA. Oddziaływania te mogą prowadzić do powstania hybryd chromatynowych, dupleksów lub tripleksów DNA, trwałych bądź przejściowych. Oddziaływania pomiędzy homologicznymi sekwencjami genów mogą być przyczyną metylacji *de novo* sekwencji DNA i/lub modyfikacji prowadzących do zjawiska zwanego wyciszaniem genów zależnym od

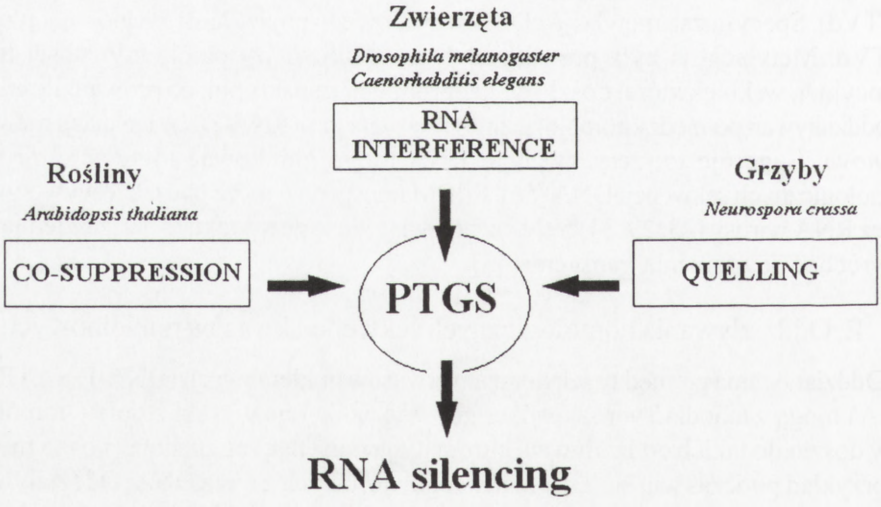
http://rcin.org.pl

homologii (ang. *homology-dependent gene silencing*, HdGS) [31, 56]. Wydaje się, że oddziaływania pomiędzy homologicznymi sekwencjami DNA mają wpływ na transkrypcyjne i potranskrypcyjne wyciszanie genów [2]. Oddziałujące ze sobą sekwencje homologiczne mogą znajdować się w układzie *cis* lub *trans*, a także w obszarze kodującym i/lub w obszarze promotora, zarówno genu jak i transgenu [56].

Na wyciszanie homologicznych transgenów mogą mieć wpływ: liczba kopii transgenu, stopień metylacji kopii, miejsce wbudowania transgenu i stopień kondensacji chromatyny. Rzadko obserwuje się, aby liczba kopii miała wpływ na HdGS bez równoczesnego wzrostu stopnia metylacji [56]. Wraz ze wzrostem liczby kopii transgenu w jednym *locus,* jak również stopnia ich metylacji częściej dochodzi do wyciszania sekwencji homologicznych. Pojedyncze kopie transgenu zwykle nie podlegają HdGS. Z dużym uproszczeniem można powiedzieć, że „wyciszany" *locus* w pewien sposób może „przeglądać" genom w poszukiwaniu regionów homologicznych. Stwierdzono, że kopie transgenu zlokalizowane w obszarze telomeru mają większe zdolności do „odnajdywania" i wyciszania regionów homologicznych [56].

IV. WYCISZANIE Z UDZIAŁEM RNA

Wyciszanie genów zależne od homologii jest spotykane u różnych organizmów i mimo że polega na podobnym mechanizmie, zostało u nich różnie nazwane. PTGS jest ogólnym terminem obejmującym: interferencję RNA (ang. *RNA interference*, RNAi) spotykaną u zwierząt, kosupresję spotykaną u roślin (wyciszanie może być indukowane



RYCINA 2. Potranskrypcyjne wyciszanie genów (PTGS) jest ogólnym terminem obejmującym: interferencję RNA (ang. *RNA interference*, RNAi), kosupresję (ang. *co-suppression*) oraz tłumienie (ang. *quelling*). Wszystkie te procesy zostały określone wspólnym terminem – wyciszanie przy udziale RNA (ang. *RNA silencing*)

http://rcin.org.pl

infekcją wirusową lub transgenem – ang. *virus-/transgene-induced gene silencing,* ViGS/TiGS) oraz wyciszanie indukowane przez obecność transgenu występujące u grzyba *Neurospora crassa* nazwane odpowiednio – tłumieniem (ang. *quelling*).

RNAi zostało opisane u nicienia *Caenorhabditis elegans* [22]. Zjawisko to obserwuje się po bezpośrednim wprowadzeniu dsRNA do organizmu, co powoduje specyficzne wyciszenie homologicznego genu endogennego i wydaje się odpowiadać PTGS u roślin. dsRNAi obserwowano również u *Trypanosoma brucei* [46] oraz *Drosophila melanogaster* [34]. W związku z tym, że prawdopodobnie ten sam mechanizm pojawia się podczas PTGS u roślin, zwierząt i grzybów (ryc. 2.) powyższe zjawiska zaczęto określać wspólnym terminem – wyciszanie z udziałem RNA (ang. *RNA silencing*).

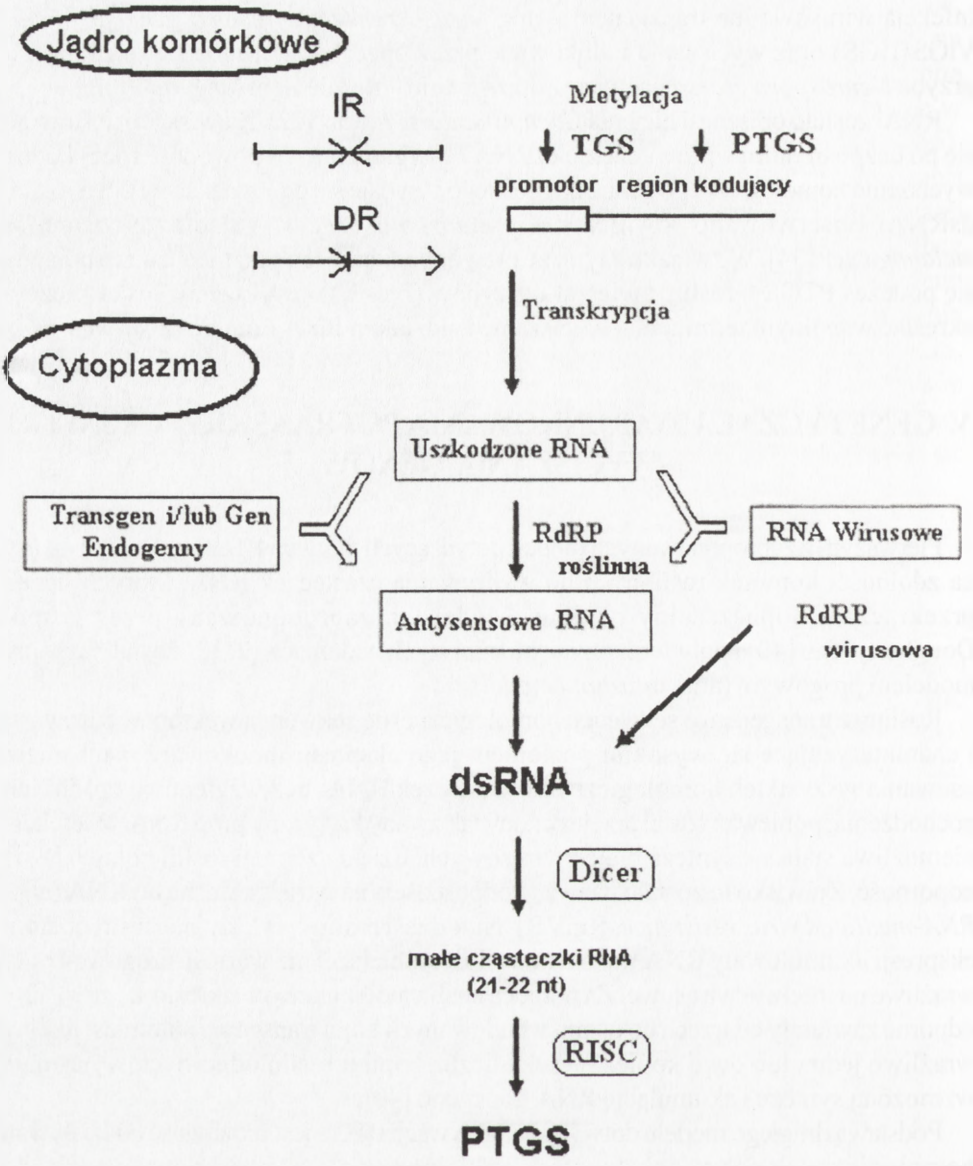
V. GENETYCZNE UWARUNKOWANIA POTRANSKRYPCYJNEGO WYCISZANIA GENÓW

Pierwszym z zaproponowanych modeli dotyczących indukcji PTGS był model oparty na zdolności komórek roślinnych do wykrywania cząsteczek RNA, których liczba przekraczała dopuszczalny poziom. Model ten zaproponowany przez zespół Dougherty'ego [40] i potwierdzony w późniejszych badaniach [2, 13] został nazwany modelem progowym (ang. *threshold model*).

Rośliny z transgenem o sekwencji homologicznej do sekwencji wektora wirusowego i charakteryzujące się wysokim poziomem jego ekspresji indukowały mechanizm usuwania wszystkich homologicznych cząsteczek RNA, bez względu na źródło ich pochodzenia, ponieważ został przekroczony tak zwany krytyczny próg RNA. W efekcie niemożliwa stała się synteza białek wirusowych, dzięki czemu u roślin pojawiała się odporność. Zjawisko to zostało nazwane odpornością na wirusa zależną od RNA (ang. *RNA-mediated virus resistance*, RmVR). Natomiast rośliny wykazujące niski poziom ekspresji akumulowały RNA transgenu w ilości mniejszej niż wartość progowa i były wrażliwe na infekcje wirusowe. Za pomocą analiz molekularnych określono, że rośliny odporne zawierały od trzech do ośmiu wbudowanych kopii transgenu, natomiast rośliny wrażliwe jedną lub dwie kopie. Wysoka liczba kopii u roślin odpornych wyjaśniała wzmożoną syntezę i akumulację RNA transgenu [40].

Podstawą drugiego modelu dotyczącego aktywacji PTGS jest możliwość oddziaływań homologicznych sekwencji kwasów nukleinowych, co może doprowadzić do przedwczesnego zakończenia transkrypcji i powstawania uszkodzonego „ściętego" RNA (ang. *aberrant RNA*, abRNA). Na matrycy abRNA przy udziale roślinnej polimerazy RNA zależnej od RNA (ang. *RNA-dependent RNA polimerase*, RdRP) są syntetyzowane krótkie cząsteczki RNA o orientacji antysensowej (asRNA ang. *antisense* RNA lub cRNA ang. *complementary RNA*) [56]. Tego rodzaju RNA może oddziaływać *in trans* z komplementarnymi sekwencjami RNA, jak np. mRNA transgenu, genu endogennego czy RNA wirusowym, prowadząc do powstania dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA), które są prawdopodobnie degradowane przez RNazę specyficzną dla dsRNA (ryc. 3).

http://rcin.org.pl



RYCINA 3. Model potranskrypcyjnego wyciszania genów (PTGS), w którym dochodzi do inicjacji przedwczesnego zakończenia transkrypcji i produkcji uszkodzonego RNA. Na matrycy abRNA przy udziale roślinnej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRP) są syntetyzowane krótkie cząsteczki RNA o orientacji antysensowej. Tego rodzaju RNA może oddziaływać *in trans* z komplementarnymi sekwencjami RNA, takimi jak np. mRNA transgenu i genu endogennego czy RNA wirusowe, prowadząc do powstania dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA), które są prawdopodobnie degradowane, najpierw do fragmentów 21–22 -nukleotydowych przy udziale kompleksu Dicer, a następnie całkowicie rozkładane przez białko RISC

http://rcin.org.pl

TABELA 1. Przykłady białek biorących udział w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów (PTGS) u różnych organizmów

Funkcja białka	*Caenorhabditis elegans*	*Drosophila melanogaster*	*Neurospora crassa*	*Arabidopsis thaliana*
Czynnik inicjacji translacji (inicjacji RNAi) *	RDE-1	DmAGO-2 [1]	QDE-2	AGO-1
Wyciszanie transpozonów	RDE-2			
	RDE-4			
	MUT-2			
RecQ, Upf1p helikaza	MUT-7 [2]		QDE-3	SDE-3
RdRP	EGO-1		QDE-1	SGS-2 [3]
?				SGS-1
?				SGS-3
RNaza III, helikaza *	K12H4.8 [4]	DCR -1		CAF-1 [4,5]
remodelowanie chromatyny				DDM-1
transferaza metylowa				MET-1

[1] – komponent RISC
[2] – posiada dodatkowo motyw RNazyD
[3] – SDE-1 – inna nazwa SGS-2
[4] – wykazują homologię do DCR-1, ale nie ma dowodów na udział w PTGS
[5] – SIN-1, SUS-1 – inne nazwy CAF-1
* białka zawierające domenę PAZ/PIWI

Znalezienie białka wykazującego podobieństwo do RdRP i biorącego udział w RNAi u *C. elegans*, może świadczyć o tym, że RdRP nie tylko uczestniczy w tworzeniu komplementarnego RNA [53], ale również w amplifikacji/regeneracji sygnału wyciszania, pozwalającego na jego rozprzestrzenianie w całym organizmie [22, 61].

Dowodem na nukleolityczną degradację RNA są krótkie, sensowe lub antysensowe fragmenty RNA, mające około 21 lub 22 nukleotydy, homologiczne do docelowego mRNA lub do genomu wirusowego. Te krótkie fragmenty RNA wykryto u roślin, gdzie zastosowano kosupresję, supresję antysensową lub ViGS. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach nad RNAi u zwierząt. Odkrycie to potwierdza również, że podstawą różnych sposobów wyciszania genów jest ten sam mechanizm.

Dokładne badania dotyczące degradacji RNA przeprowadzono na zarodkach *D. melanogaster* [8]. Do analiz wykorzystano znakowane RNA, homologiczne do docelowego ssRNA. Największa degradacja ssRNA następowała po podaniu dsRNA, natomiast wprowadzanie sensowej lub antysensowej formy RNA nie dawało takiego rezultatu. Przypuszczalny mechanizm degradacji dsRNA u *D. melanogaster* rozpoczynał się od przyłączenia kompleksu białkowego Dicer-1 do obu końców nici dsRNA i odcięcia krótkich odcinków o długości 21–22 nukleotydów [8], które również znaleziono u roślin wykazujących PTGS [24]. Następnie nowe kompleksy białkowe przyłączają się kolejno do powstałych wolnych końców dsRNA i następuje dalsze odcinanie do momentu, aż cała nić dsRNA będzie pofragmentowana na krótkie 21–22 -nukleotydowe odcinki. Natomiast wewnątrz kompleksu białkowego dochodzi do rozdzielenia nici dsRNA i do każdej z nich kompleks białkowy poszukuje komplementarnej nici ssRNA. Po odnalezieniu komplementarnej nici i przyłączeniu się do niej kompleksu następuje jej przecięcie w miejscu, które odpowiada środkowi 21–22-nukleotydowej sekwencji związanej wcześniej z

http://rcin.org.pl

kompleksem białkowym. Ostatecznie krótkie fragmenty ssRNA podlegają całkowitej degradacji przy udziale kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) o aktywności nukleazy [8, 25]. Jednym z komponentów RISC jest białko AGO-2, które wykazuje podobieństwo w domenie PAZ z białkiem Dicer. Sugeruje się, że oddziaływania pomiędzy domenami PAZ pozwalają przenosić krótkie fragmenty dsRNA z kompleksu Dicer do RISC. Przypuszczalnie u roślin proces degradacji dsRNA ma podobny przebieg.

Analiza genetyczna kosupresji u *A. thaliana*, tłumienia u *N. crassa* i RNAi u *C. elegans* pozwoliła na wyróżnienie dwóch grup podobnych białek:

(1) SGS-2, QDE-1, EGO-1 [14, 45, 53] spełniających funkcję roślinnej RdRP (tab. 1). Homologia tych trzech białek jest pierwszym dowodem, że PTGS u roślin i grzybów oraz zwierząt odbywa się drogą tego samego mechanizmu genetycznego;

(2) AGO-1, QDE-2, RDE-1 [11, 21, 44, 57], zawierające domeny PAZ i PIWI [12] (tab. 1). Podobieństwo tych białek u różnych organizmów potwierdza przypuszczenie, że mechanizm wyciszania jest szeroko rozpowszechnioną formą ochrony przed obcymi kwasami nukleinowymi. Zostało to dodatkowo potwierdzone w badaniach przeprowadzonych na mutantach *Arabidopsis thaliana* (*sgs-2, sgs-3, sde-3*), wykazujących nadwrażliwość na infekcje wirusowe [18, 45].

Istnieją też inne białka istotne dla procesu PTGS nazwane białkami wyciszającymi. Wykazują one homologię do helikaz: RecQ (gen QDE-3 u *N. crassa* oraz gen *MUT-7* u *C. elegans*) [15, 35] i Upf1p (gen *SDE-3* u *A. thaliana*) [18]. Białka te nie zastępują kompleksu białkowego Dicer-1, ani też nie wchodzą w jego skład. Zarówno w genomie *A. thaliana,* jak i *C. elegans* znaleziono geny kodujące białka homologiczne do Dicer-1, odpowiednio CAF1 i K12H4.8. Obydwa białka nazwane białkami podobnymi do Dicer (ang. *Dicer-like protein*) zawierają charakterystyczne elementy: domenę RNA helikazy, motyw RNazy III i domenę PAZ [8, 12] (tab. 1).

Zbadano też kolejne białka mogące brać udział w wyciszaniu genów na poziomie potranskrypcyjnym. Są to białka oddziałujące na strukturę lub status transkrypcyjny chromatyny: DDM1 (remodelowanie chromatyny, także udział w wyciszaniu transpozonów) [26, 28], MET1 (metylotransferaza) [32], białka RDE-2 [19] i MUT-2 [36], zaangażowane w aktywność transpozonów oraz białka SGS-3 z *A. thaliana* [43] i RDE-4 z *C. elegans* [58], ale ich dokładna funkcja nie została dotychczas poznana.

VI. WYCISZANIE GENÓW INDUKOWANE WIRUSEM (VIGS)

Wiadomo, że rośliny potrafią bronić się przed atakiem wirusów. Od dawna obserwuje się odporność krzyżową (ang. *cross-protection*), pojawiającą się u roślin po inokulacji osłabionymi szczepami wirusów. Ten rodzaj szczepionki zapobiega powtórnej akumulacji szczepów wirusowych, które są blisko spokrewnione z osłabionym szczepem wirusa. W przypadku niektórych wirusów roślinnych mechanizm tej odporności opiera się na tych samych zasadach jak PTGS i zależy od homologii sekwencji nukleotydowej [50].

http://rcin.org.pl

Początkowo uważano, że nadekspresja któregoś z wirusowych białek w roślinie jest odpowiedzialna za nabycie odporności przeciwko wirusowi, którego fragment sekwencji znajdował się w transgenie [48]. Jednak kolejne badania dowiodły, że za to zjawisko w większości przypadków odpowiedzialne jest mRNA, a nie białko [64]. Po raz pierwszy zostało to potwierdzone w 1992 roku, na roślinach wykazujących odporność na wirusa, po wprowadzeniu do nich sekwencji kodującej białko płaszcza wirusowego, ale nie ulegającej translacji poprzez mutację wytwarzającą kodon stop w niewielkiej odległości od kodonu AUG [40]. Zjawisko to zostało już wielokrotnie wykorzystane do nadania różnym gatunkom roślin odporności na wirusy i określane jest jako odporność wirusowa zależna od RNA (ang. *RNA-mediated virus resistance*, RmVR) (tab. 2 *). Najczęściej do tego celu wykorzystuje się sekwencje kodujące białka płaszcza różnych wirusów. RmVR jest tożsamy z ogólnym pojęciem wyciszania genów indukowanego wirusem (ViGS). Genom wirusa może być odpowiednio genetycznie zmodyfikowany.

U roślin infekowanych wektorem PVX niosącym fragment genu endogennego gospodarza obserwowano zmiany fenotypowe charakterystyczne dla mutantów genu. Było to spowodowane obniżeniem poziomu odpowiedniego mRNA w komórce gospodarza [52]. Zjawisko ViGS, zostało opisane dla wielu różnych kombinacji wirus/roślina (tab. 2). Dodatkowo okazało się, że wirusy w naturalny sposób aktywują wyciszanie z udziałem RNA (ang. *RNA silencing*) podczas infekcji, co jest kolejnym dowodem ogólnej odpowiedzi obronnej roślin na atak zarówno RNA, jak i DNA wirusów.

Wyciszanie potranskrypcyjne indukowane wirusem jest powodowane obecnością genomowego RNA wirusa w roślinie, co może prowadzić do powstawania cząsteczek dsRNA, będących prawdopodobnie czynnikiem indukującym. Natomiast wyciszanie

TABELA 2. Przykłady wyciszania genów indukowanego wirusem (ViGS)

Wirus	Gatunek rośliny	Docelowy gen	Referencje
PPV	*Nicotiana benthamiana*	transgen replikazy PPV*	[23]
PSbMV	*Pisum sativum*	transgen replikazy PSbMV*	[30]
PVX	*Nicotiana benthamiana*	desaturaza fitoenowa, mała podj. Rubisco, syntaza celulozy, transgen GFP	[10, 31, 52, 59]
TRV	*Nicotiana benthamiana*	desaturaza fitoenowa, mała podj. Rubisco, homolog LEAFY, transferaza metylowa 1, transgen GFP, fragment promotora 35S,	[16, 32, 51]
	Arabidopsis thaliana	desaturaza fitoenowa, transgen GFP	
TuMV	*Nicotiana benthamiana*	transgen białka płaszcza TuMV*	[27]
TGMV	*Nicotiana benthamiana*	chelataza magnezowa, transgen lucyferazy	[37]
TYDV	*Petunia hybrida*	transgen syntazy chalkonowej	[5]

* Niektóre przykłady ViGS są zarazem przykładami RmVR.

http://rcin.org.pl

na poziomie transkrypcji może być powodowane obecnością homologicznej sekwencji promotora w wektorze wirusowym [32].

VII. SUPRESJA VIGS

Pomimo zdolności roślin do reakcji na obecność wirusów, polegającej na wyciszeniu z udziałem RNA, wirusy potrafią przełamać tę obronę. Podczas koinokulacji roślin nieszkodliwym wirusem wraz z potywirusem dochodziło do wyjątkowego nasilenia symptomów spowodowanego wysoką akumulacją nieszkodliwego wirusa. Ten synergizm wynikał z supresji mechanizmu obronnego gospodarza, który w normalnych warunkach ograniczał namnażanie się nieszkodliwego wirusa. Do supresji tej dochodziło przy udziale proteazy Hc (HcPro) z potywirusa [49]. Rola HcPro w supresji PTGS została potwierdzona przez trzy niezależne grupy badawcze [3, 9, 33]. Okazało się, że w hamowaniu odpowiedzi roślin na atak wirusa ma udział również kilka innych białek zaangażowanych w wyciszanie indukowane transgenem (TiGS), które uprzednio uważano za odpowiedzialne za patogeniczność wirusa [62]. Są to białka: 2b (z cucumo-), P1 (z sobemo-), 19K (z tombus-RNA wirusa) oraz Ac2 z DNA geminiwirusa. Podobnie białko p25 z PVX, odpowiedzialne za przemieszczanie się [63] oraz P15 z PCV [20], które jest małym, bogatym w cysteiny białkiem, zostały uznane za supresory wyciszania.

Obecnie niewiele wiadomo, co dokładnie jest celem supresorów wyciszania pochodzenia wirusowego. Z badań wynika, że białka 2b i HcPro, mające różne sekwencje aminokwasowe, hamują PTGS na różnych etapach. Proteaza Hc hamuje wyciszanie w tkankach, gdzie ten proces już zachodzi, natomiast białko 2b hamuje inicjację PTGS [6, 9]. Aby białko 2b mogło hamować PTGS, musi dojść do jego akumulacji w jądrze, o czym świadczy obecność bogatego w argininy sygnału lokalizacji jądrowej w sekwencji tego białka [41]. Wynika z tego, że chociaż degradacja dsRNA zachodzi na terenie cytoplazmy, to wyciszanie może być już blokowane w jądrze komórkowym.

Białkowe supresory wyciszania zostały już wykorzystane do uzyskiwania wysokiego poziomu ekspresji transgenu przez zastosowanie amplikonu łącznie z wirusowym supresorem PTGS, niesionym na oddzielnym pomocniczym wektorze wirusowym [42].

VIII. BADANIE FUNKCJI GENÓW

W związku z rozwijającą się w ostatnich latach tzw. „*reverse genetic*", wyciszanie genów nabrało większego znaczenia, ponieważ dzięki wprowadzeniu do organizmu odpowiedniej konstrukcji genowej można skuteczniej hamować ekspresję konkretnych genów. Może to być wykorzystane do badania funkcji genów w organizmie. Sekwencjonowanie całych genomów wielu organizmów pozwoliło na zdobycie wiedzy

http://rcin.org.pl

o rejonach kodujących, organizacji genomu, sekwencjach telomerowych, centromerowych i powtarzających się oraz transpozonach, ale z drugiej strony badania te ujawniły wiele genów o nieznanych dotąd funkcjach. U *Arabidopsis thaliana* liczba genów o nieznanych funkcjach sięga 30%, co odpowiada około 7 650 genom. Utrudnieniem może być fakt, że u roślin występuje około 150 unikalnych rodzin białek zawierających zarówno białka strukturalne, enzymy, jak i białka o nieznanej funkcji [1].

Stosowanie konwencjonalnych metod, na przykład mutagenezy insercyjnej, w celu poznania funkcji genów jest bardzo czasochłonne i wymaga ogromnych populacji mutantów. Obliczono na przykład, że przy 90% szans znalezienia tylko jednego genu (~1kpz) u *Arabidopsis* z użyciem mutagenezy za pomocą T-DNA należałoby uzyskać około 350 000 niezależnych transformantów [39].

Jedną z metod pozwalającą na ustalenie funkcji nieznanego genu jest supresja sekwencją antysensową. Jej podstawą jest mechanizm wyciszania potranskrypcyjnego, podczas którego następuje specyficzna dla sekwencji degradacja RNA. Wprowadzenie sekwencji antysensowych teoretycznie powinno zwiększyć PTGS, polegający na degradacji dsRNA powstałego przez łączenie się cząsteczek sensowej i antysensowej RNA. Tymczasem okazało się, że zazwyczaj tak nie jest. Przez wprowadzanie do organizmu sekwencji sensowej (kosupresja) często otrzymywano większy stopień wyciszenia niż w przypadku sekwencji antysensowej.

Wyniki ostatnich badań wskazują, że użycie odpowiedniej konstrukcji kodującej RNA o strukturze szpilki do włosów (*hairpin RNA*, hpRNA), dzięki odpowiedniemu ułożeniu następujących elementów: sekwencja sensowa-łącznik (ang. *spacer*)-sekwencja antysensowa, powoduje indukcję PTGS przeciwko wirusom bądź genom endogennym z wydajnością równą prawie 100% [54]. Chcąc sprawdzić efekt działania konstrukcji niezawierającej łącznika, wprowadzono zamiast niego sekwencję intronową. Pełniła ona funkcję stabilizującą DNA i była wycinana podczas obróbki pre-mRNA, pozostawiając kilku-lub kilkunastonukleotydową pętlę. W przypadku roślin transformowanych konstrukcją zawierającą intron (ihpRNA) skuteczność wyciszenia genu docelowego sięgała 96–100% [54, 64, 65]. Przykładem takiego wydajnego wektora jest pHannibal. Umożliwia on stosunkowo łatwe wprowadzenie produktów PCR w orientacji sensowej i zarazem antysensowej, dzięki umiejscowieniu w wektorze dwóch oddzielnych polilinkerów i użyciu starterów zawierających odpowiednie miejsca restrykcyjne. Przygotowanie produktów PCR może odbywać się w drodze dwóch oddzielnych reakcji amplifikacji ze starterami zawierającymi pojedyncze miejsca restrykcyjne lub w drodze jednej reakcji amplifikacji ze starterami zawierającymi dwa miejsca restrykcyjne każdy. Skuteczność pHannibala była sprawdzana dla różnych genów, np. dla genu syntazy chalkonowej wprowadzonego do *Arabidopsis* wynosiła 90% (wyciszenie miało miejsce u 21 na 23 badane rośliny) [65].

Wektor pHannibal stał się podstawą do przygotowania równie wydajnej, ale łatwiejszej w obróbce laboratoryjnej konstrukcji o nazwie pHellsgate. Łatwość obróbki polega na pominięciu jednoetapowego procesu ligacji czterech fragmentów, koniecznego w przypadku wprowadzania sekwencji do pHannibal. Sekwencje wprowadzane do pHellsgate są również produktami PCR, ale wygenerowanymi przy użyciu starterów

http://rcin.org.pl

zawierających miejsca: attB1 i attB2, rekombinujące z miejscami attP1 i attP2 znajdującymi się w plazmidzie. Dzięki temu, do wprowadzenia żądanej sekwencji trzeba przeprowadzić tylko jedną reakcję amplifikacji, a powstałe produkty utworzą spontanicznie dwa ramiona struktury szpilki do włosów. Zrekombinowany wektor pHellsgate jest binarnym wektorem wysokokopijnym i może być bezpośrednio wprowadzany do *Agrobacterium* [65].

Znajomość relacji pomiędzy wirusami a wyciszaniem została również wykorzystana do stworzenia wydajnej metody badania funkcji genów u roślin. Metoda ta opiera się na zjawisku ViGS i polega na obserwacji ekspresji genu u roślin, która może być hamowana w sposób specyficzny dla sekwencji poprzez infekcję wektorem wirusowym niosącym fragment genu gospodarza, który ma być wyciszony [7]. Za pomocą ViGS zbadano z powodzeniem dużą liczbę jądrowych genów endogennych i transgenów [31], pomimo że nie jest jasne, czy endogenne mRNA jest zaangażowane w aktywowanie i/lub utrzymanie wyciszania.

Uzyskany efekt ViGS może być przejściowy bądź trwały. Efekt przejściowy jest osiągany przez inokulację roślin infekcyjnymi klonami wirusa, natomiast efekt trwały przez transformację konstrukcją genową, zawierającą pod odpowiednim promotorem zmodyfikowane cDNA replikatywnej formy wirusa połączone z fragmentem genu gospodarza. Tak przygotowaną konstrukcję określa się nazwą amplikon [17]. Transformacja roślin taką konstrukcją zapewnia stabilny i dziedziczny fenotyp wyciszony [4]. Jedynym utrudnieniem w tej metodzie jest etap transformacji, który przedłuża czas uzyskania wyniku, natomiast do ustalenia relacji pomiędzy genem a fenotypem przez inokulację czy infiltrację liści może dojść w czasie kilku tygodni. Amplikony oparte na PVX mogą być wykorzystane do wyciszenia genów u roślin nienależących do rodziny *Solanaceae* (np. *Arabidopsis*), u których PVX jest zdolny do namnażania się, ale nie do systemicznego rozprzestrzeniania i akumulacji [17].

Metoda wykorzystująca ViGS może być użyta również do badania genów potencjalnie letalnych, ponieważ geny wprowadza się w stadium siewki [52]. Kolejną zaletą metody ViGS jest rozprzestrzenianie się wyciszenia do odległych tkanek roślinnych przez sygnały specyficzne dla sekwencji, podczas gdy infekcja wirusowa jest ograniczona do inokulowanej tkanki.

W niektórych przypadkach infekcja wirusowa stosowana w ViGS może doprowadzić do nadmiernej chlorozy, nekrozy i zniekształcenia liści, co znacznie osłabia rośliny oraz może zacierać faktyczny fenotyp spowodowany wyciszeniem. Kolejną wadą tej metody jest to, że wirusy nie wnikają do każdej komórki, a czas rozchodzenia się sygnału wyciszania jest różny dla różnych tkanek. Dlatego nie wszystkie komórki mogą wykazywać fenotyp wyciszony po tym samym czasie.

U *Nicotiana benthamiana* zbadano zdolność wywoływania ViGS przez różne fragmenty genu endogennego PDS wbudowane do wektora PVX [52]. Gen PDS koduje desaturazę fitoenową odpowiedzialną za biosyntezę karotenoidów. Zahamowanie ekspresji tego genu powoduje efekt fotowybielania u roślin. Genom dzikiego wirusa PVX koduje kolejno od końca 5': białko polimerazy RNA zależnej od RNA, białka 25kD, 12 kDa, 8 kDa i białko płaszcza (ang. *coat protein*, CP). W wektorze PVX transgeny umieszczano pomiędzy białkiem 8 kDa a białkiem CP. Sprawdzono zdolność

http://rcin.org.pl

wywoływania ViGS przez cztery fragmenty genu PDS, każdy w orientacji sensowej i antysensowej. Dwa spośród tych czterech fragmentów były sekwencjami intronowymi. Jeden z końca 5' genu o długości 167nt – region nie ulegający translacji (5'UTR), a drugi 223-nukleotydowy intron z końca 3' (INT). Dwa pozostałe fragmenty to 377-nukleotydowa sekwencja kodująca pochodząca z końca 5' (5»PDS) i 415- nukleotydowa sekwencja kodująca z centralnego regionu genu (PDS). Dodatkowo zbadano działanie krótkiego fragmentu (212 nt) pochodzącego z fragmentu 415-nukleotydowego (PDSdef) wbudowanego do wektora również w obu orientacjach. Po inokulacji roślin dziesięcioma kombinacjami wektorów efekt wybielania nie pojawił się w przypadku obu sekwencji intronowych. Zasugerowano, że w tym przypadku brak ViGS dowodzi, że mechanizm ten jest inicjowany w cytoplazmie, a wyciszenie genu PDS działa na poziomie potranskrypcyjnym. Fotowybielanie liści w pozostałych przypadkach pojawiało się po 10–15 dniach od inokulacji (ang. *days postinoculation*, DPI). Dwa tygodnie jest stosunkowo krótkim okresem oczekiwania na pojawienie się efektu wyciszenia genu, co jest niepodważalnie zaletą ViGS. Indukcja wyciszenia w tym przypadku przez sekwencje sensowe i antysensowe pojawiała się w tym samym czasie, a efektywność była na tym samym poziomie.

Wykorzystując praktycznie metodę ViGS przeprowadzono u *Nicotiana benthamiana* funkcjonalną analizę przypuszczalnego genu syntazy celulozowej (CesA) [10]. Skonstruowano trzy wektory na podstawie PVX z fragmentami genu NtCesA. Fragmenty CesA1a (670 nt) i CesA1b (377) wykazywały identyczność sekwencji nukleotydowej, różniły się tylko długością. Natomiast fragment CesA2 (485 nt) wykazywał 80% identyczności sekwencji nukleotydowej z CesA1a na końcu 3'. Zmiany fenotypowe wywołane przez wprowadzenie wektorów PVX-CesA1a i -CesA1b były podobne: niski wzrost i mniejsze liście niż u roślin kontrolnych, natomiast odmienne od tych wywołanych przez PVX-CesA2, który nie spowodował drastycznej zmiany w wysokości roślin i wielkości liści. U roślin niskich obserwowano również zmiany w budowie niektórych komórek epidermy liści i pędu. Komórki te były powiększone i wypuklały się ponad powierzchnię liści, a zawartość celulozy w ścianach komórkowych była około 25% niższa. Towarzyszyły temu wzrost o 45% homogalakturonianu i zmniejszenie stopnia estryfikacji polisacharydów pektynowych z 50 do 33%. Uzyskane wyniki świadczą o wyciszeniu u *N. benthamiana* genu lub genów syntazy celulozowej i potwierdzają przydatność ViGS w analizie funkcji nieznanych genów.

Spośród wektorów wirusowych wykorzystywanych do badań (tab. 2) najlepszym wydaje się być wektor skonstruowany przy użyciu TRV (*tobacco rattle virus*). Wektor ten wywołuje łagodne objawy, infekuje dużą liczbę komórek, stan wyciszenia utrzymuje się dłużej i może, w przeciwieństwie do innych wirusów, wyciszać geny ulegające ekspresji w tkankach merystematycznych [51]. TRV jest jednoniciowym, dwucząsteczkowym RNA wirusem. Białka kodowane przez RNA 1 odpowiadają za replikację i przemieszczanie się wewnątrz rośliny, natomiast białka kodowane przez RNA 2 odpowiadają za formowanie się wirusa i jego przemieszczanie między roślinami za pomocą nicieni. Z RNA 1 i 2 skonstruowane zostały dwa oddzielne klony cDNA pod kontrolą promotora 35S z CaMV, które zostały wbudowane do binarnego wektora

http://rcin.org.pl

w miejsce wielokrotnego klonowania w obrębie T-DNA [51]. Konstrukcja RNA 1 TRV (pBINTRA6) zawierała pełnej długości infekcyjny klon cDNA, w którym ramka odczytu polimerazy RNA została przerwana przez wbudowanie intronu 3 genu reduktazy azotanowej z *Arabidopsis*. Wbudowanie intronu pozwoliło na stabilne utrzymanie klonu w komórkach *Escherichia coli*. Natomiast w konstrukcji RNA 2 TRV (pTV00) pozostawiono sekwencje kodujące białko płaszcza wirusa, a usunięto nieistotne rejony kodujące białka 29,4 k i 32,8 k pozostawiając tylko nieulegające translacji fragmenty 3' i 5' i wbudowując w środku polilinker. Rośliny inokulowano nanosząc na liście mieszaninę kultur *Agrobacterium* zawierającą pBINTRA6 i pTV00 [51]. W ten sposób amplikony są wprowadzane do rośliny i dzięki przejściowej ekspresji uzyskuje się transkrypty wirusowe [51]. Drugą i częściej stosowaną metodą otrzymywania klonów infekcyjnych jest namnożenie RNA klonów za pomocą transkrypcji *in vitro*, a następnie inokulowanie nimi roślin z zastosowaniem karborundu jako środka mechanicznie uszkadzającego tkankę i ułatwiającego wnikanie cząsteczek infekcyjnych [10, 52].

Praktyczną zaletą wektorów wirusowych jest również to, że do wyciszenia genu endogennego wystarczą zaledwie 33-nukleotydowe fragmenty, w pełni homologiczne do połowy 3' genu. Wprawdzie okazało się, że większe fragmenty (51–52 nt) są bardziej efektywne w inicjowaniu wyciszania niż fragmenty 33–34 nt, to jednak fragment 33–34 nt w orientacji antysensowej był bardziej efektywny niż 51–52 nt fragment w orientacji sensowej. Najlepsze efekty uzyskano w przypadku fragmentu antysensowego o długości 51 nt. Wynik ten świadczy o tym, że orientacja genu w konstrukcji może mieć większy wpływ na wyciszenie niż długość użytego fragmentu [59].

Ostatnio uzyskano efekt wyciszenia przez wprowadzanie do roślin sekwencji promotorowych genów endogennych [31]. Wyciszenie działa tutaj w układzie *trans* tzn. inaktywacji ulegają geny znajdujące się pod kontrolą homologicznego promotora, a ponieważ sekwencje promotorów są bardziej różnorodne niż regiony kodujące w obrębie wielogenowej rodziny metoda ta pozwala na bardziej precyzyjną inaktywację danego genu.

IX. PODSUMOWANIE

Wyciszanie genów z pewnością jest utrudnieniem dla wielu badaczy chcących z dużą sprawnością uzyskiwać nowe, ważne gospodarczo cechy u roślin. Transgeny jednak nie zawsze wywołują PTGS, efekt taki pojawia się u stosunkowo małego procentu transformowanych roślin. Na przykład u ryżu wyciszenie występowało u 23% roślin transformowanych genem chitynazy, dopiero w pokoleniu T_3 linii homozygotycznych pod względem transgenu [13].

Z drugiej strony, po poznaniu mechanizmów wyciszania, znajduje ono wiele praktycznych zastosowań przez specyficzne zahamowanie ekspresji genów. Za przykład może tu służyć pomidor Flavr-Savr, wprowadzony do sprzedaży przez amerykańską

http://rcin.org.pl

firmę Calgene. Do tej odmiany pomidora wprowadzono antysensową kopię genu poligalakturonazy, co doprowadziło do wyciszenia właściwego genu, odpowiedzialnego za mięknięcie dojrzewających owoców. Otrzymano w ten sposób obniżenie syntezy białka, którego aktywność enzymatyczna polega na trawieniu pektyny odpowiedzialnej za twardość owoców, co w rezultacie powoduje spowolnienie mięknięcia owoców, a to przedłuża okres ich przechowywania.

Wyciszanie staje się też coraz powszechniejszym sposobem w badaniach funkcji genów. Zasada jest prosta: fragment genu jest wprowadzany do komórki jako dsRNA lub w takiej formie, z której nastąpi transkrypcja dsRNA. dsRNA aktywuje proces, w którym udział biorą Dicer i RISC i w ten sposób dochodzi do zmiany właściwości danej komórki wskutek utraty funkcji odpowiedniego genu.

LITERATURA

[1] AGI: THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 796–815.

[2] AL-KAFF NS, COVEY SN, KREIKE MM, PAGE AM, PINDER R, DALE PJ. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 1998; **279**: 2113–2115.

[3] ANANDALAKSHIMI R, PRUSS GJ, GE X, MARATHE R, SMITH TH, VANCE VB. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13079–13084.

[4] ANGELL SM, BAULCOMBE DC. Potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. *Plant J* 1999; **20**: 357–362.

[5] ATKINSON RG, BIELESKI LRF, GLEAVE AP, JANSSEN B-J, MORRIS BAM. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. *Plant J* 1998; **15**: 593–604.

[6] BECLIN C, BERTHOME R, PALAUQUI JC, TEPFER M, VAUCHERET H. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* 1998; **252**: 313–317.

[7] BAULCOMBE DC. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 109–113.

[8] BERNSTEIN E, CAUDY A, HAMMOND S, HANNON G. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; **409**: 363–366.

[9] 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.

[10] BURTON RA, GIBEAUT DM, BACIC A, FINDLAY K, ROBERTS K, HAMILTON A, BAULCOMBE DC, FINCHER GB. Virus-induced gene silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* 2000; **12**: 691–705.

[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] CHAREONPORNWATTANA S, THARA KV, WANG L, DATTA SK, PANBANGRED W, MUTHUKRISHNAN S. Inheritance, expression, and silencing of chitinase transgene in rice. *Theor Appl Genet* 1999; **98**: 371–378.

[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. Post-transcriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 1999; **286**: 342–344.

http://rcin.org.pl

[16] DALMAY T, HAMILTON A, RUDD S, ANGELL S, BAULCOMBE D. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000; **101**: 543–553.
[17] DALMAY T, HAMILTON A, MUELLER E, BAULCOMBE DC. Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell* 2000; **12**: 369–379.
[18] DALMAY T, HORSEFIELD R, BRAUNSTEIN T, BAULCOMBE D. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2001; **20**: 2069–2078.
[19] DERNBURG AF, ZALEVSKY J, COLAIACOVO MP, VILLENEUVE AM. Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes Dev* 2000; **14**(13):1578–1583.
[20] DUNOYER P, PFEFFER S, FRITSCH C, HEMMER O, VOINNET O, RICHARDS KE. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 2002; **29**: 555–567.
[21] FAGARD M, BOUTET S, MOREL J, BELLINI C, VAUCHERET H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11650–11654.
[22] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806–811.
[23] GUO HS, LOPEZ-MOYA JJ, GARCIA JA. Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Mol Plant-Microbe Interact* 1999; **12**: 103–111.
[24] HAMILTON A, BAULCOMBE D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999; **286**: 950–952.
[25] HAMMOND SM, BERNSTEIN E, BEACH D, HANNON G. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cell extracts. *Nature* 2000; **404**: 293–296.
[26] HIROCHIKA H, OKAMOTO H, KAKUTANI T. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the ddm1 mutation. *Plant Cell* 2000; **12**: 357–368.
[27] JAN F-J, PANG S-Z, FAGOAGA C, GONSALVES D. Turnip mosaic potyvirus resistance in *Nicotiana benthamiana* derived by post-transcriptional gene silencing. *Transgenic Res* 1999; **8**: 203–213.
[28] JEDDELOH JA, STOKES TL, RICHARDS EJ. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genet* 1999; **22**: 94–97.
[29] JONES AL, THOMAS CL, MAULE AJ. *De novo* methylation and cosuppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J* 1998; **17**: 6385–6393.
[30] JONES AL, JOHANSEN IE, BEAN SJ, BACH I, MAULE AJ. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *J Gen Virol* 1998; **79**: 3129–3137.
[31] JONES L, HAMILTON AJ, VOINNET O, THOMAS CL, MAULE AJ, BAULCOMBE DC. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 1999; **11**: 2291–2302.
[32] JONES L, RATCLIFF F, BAULCOMBE DC. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 2001; **11**: 747–757.
[33] KASSCHAU KD, CARRINGTON JC. A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* 1998; **95**: 461–470.
[34] KENNERDELL JR, CARTHEW RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the Wingless pathway. *Cell* 1998; **95**: 1017–1026.
[35] KETTING RF, HAVERKAMP THA, VAN LUENEN HGA, PLASTERK RHA. mut-7 of *C. elegans* required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome helicase RNase D. *Cell* 1999; **99**: 133–141.
[36] KETTING RF, PLASTERK RH. A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 2000; **404**: 296–298.
[37] KJEMTRUP S, SAMPSON KS, PEELE CG, NGUYEN LV, CONKLING MA, THOMPSON WF, ROBERTSON D. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J* 1998; **14**: 91–100.
[38] KOTER M, HENNING J. Wyciszanie ekspresji genów i nowe narzędzia biologii molekularnej roślin. *Post Bioch* 2002; **48**(3): 182–188.
[39] KRYSAN PJ, YOUNG JC, SUSSMAN MR. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 2283–2290.

http://rcin.org.pl

[40] LINDBO JA, DOUGHERTY WG. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 1992; **189**: 725–733.
[41] LUCY AP, GOU HS, LI WX, DING SW. Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J* 2000; **19**: 1672–1680.
[42] MALLORY AC, PARKS G, ENDRES MW, BAULCOMBE D, BOWMAN LH, PRUSS GJ, VANCE VB. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nature Biotech* 2002; **20**: 622–625.
[43] METTE MF, VAN DER WINDEN J, MATZKE MA, MATZKE AJM. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters *in trans*. *EMBO J* 1999; **18**: 241–248.
[44] MOREL JB, GODON CH, MOURRAIN P, BECLIN CH, BOUTET S, FEUERBACH F, PROUX F, VAUCHERET H. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 2002; **14**: 629–639.
[45] MOURRAIN P, BECLIN C, ELMAYAN T, FEUERBACH F, GODON C, MOREL JB, JOUETTE D, LACOMBE AM, NIKIC S, PICAULT N, REMOUE K, SANIAL M, VO TA, VAUCHERET H. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000; **101**: 533–542.
[46] NGO H, TSCHUDI K, GULL K, ULLU E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 14687–14692.
[47] PAŁUCHA A. Wirusy roślinne jako wektory do wyrażania obcych genów. *Biotechnologia* 2002; **1**: 105–112.
[48] POWELL PA, SANDERS PR, TUMER N, FRALEY RT, BEACHY RN. Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 1990; **175**: 124–130.
[49] PRUSS G, GE X, SHI XM, CARRINGTON JC, VANCE VB. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologus viruses. *Plant Cell* 1997; **9**: 859–868.
[50] RATCLIFF F, HARRISON BD, BAULCOMBE DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 1997; **276**: 1558–1560.
[51] RATCLIFF F, MARTIN-HERNANDEZ AM, BAULCOMBE DC. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 2001; **25**: 237–245.
[52] RUIZ MT, VOINNET O, BAULCOMBE DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 1998; **10**: 937–946.
[53] SMARDON A, SPOERKE JM, STACEY SC, KLEIN ME, MACKIN N, MAINE EM. 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 NA, SNIGH SP, WANG M-B, STOUTJESDIJK PA, GREEN AG, WATERHOUSE PM. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 2000; **407**: 319–320.
[55] STAM M, DE BRUIN R, KENTER S, VAN DER HOORN RAL, VAN BLOKLAND R, MOL JNM, KOOTER JM. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J* 1997; **12**: 63–82.
[56] STAM M, MOL JNM, KOOTER JM. The silence of genes in transgenic plants. *Ann Bot* 1997; **79**: 3–12
[57] TABARA H, SARKISSIAN M, KELLY WG, FLEENOR J, GRISHOK A, TIMMONS L, FIRE A, MELLO CC. The rde-1 gene, RNA interference and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999; **99**: 123–132.
[58] TABARA H, YIGIT E, SIOMI H, MELLO CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEAH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 2002; **109**: 861–871.
[59] THOMAS CL, JONES L, BAULCOMBE DC, MAULE AJ. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J* 2001; **25**: 1–11.
[60] VAZQUEZ ROVERE C, DEL VAS M, ESTEBAN HOPP H. RNA-mediated virus resistance. *Curr Opin Biotech* 2002; **13**: 167–172.
[61] 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.

http://rcin.org.pl

[62] VOINNET O, PINTO YM, BAULCOMBE DC. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14147–14152.
[63] VOINNET O, LEDERER C, BAULCOMBE DC. A viral movement protein prevents systemic spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 2000; **103**: 157–167.
[64] WATERHOUSE PM, GRAHAM MW, WANG M-B. 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.
[65] WESLEY SV, HELLIWELL CA, SMITH NA, WANG M-B, ROUSE DT, LIU Q, GOODING PS, SNIGH SP, ABBOTT D, STOUTJESDIJK PA, ROBINSON SP, GLEAVE AP, GREEN AG, WATERHOUSE PM. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 2001; **27**: 581–590.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 31.10.2002 r.
Przyjęto: 30.12.2002 r.
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa
e-mail: wisniewskaan@alpha.sggw.waw.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (359–374)

UKŁAD NADZORUJĄCY GENOM

GENOME SURVEILLANCE SYSTEM

Irena SZUMIEL

Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

Streszczenie: *Podstawy zagadnienia*: DNA komórkowy podlega nieustannym uszkodzeniom; działanie punktów kontrolnych cyklu komórkowego jest częścią odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie DNA. *1. Układ nadzorujący genom a przechodzenie przez cykl komórkowy* W miarę badania regulacji cyklu komórkowego odkrywano powiązania mechanizmów regulacyjnych ze skomplikowaną siecią dróg sygnalizacyjnych, którą nazwano układem nadzorującym genom. *2. Odpowiedź komórkowa na uszkodzenia DNA.* Białka w układzie nadzorującym odpowiadające na uszkodzenia DNA to: kinazy białkowe typu PIKL (podobne do kinazy fosfatydyloinozytolu); białka tworzące trimery podobnie jak antygen jądrowy komórek proliferujących, PCNA (*ang. proliferating cell nuclear antigen*); białka czujnikowe (tzw. kompleks 9-1-1); kinazy serynowo-treoninowe (Chk 1 i Chk 2), tzw. kinazy efektorowe; białka adaptorowe. Uszkodzenie DNA generuje sygnał alarmowy, przekazywany do układów naprawy DNA oraz aktywujący geny potrzebne do zatrzymania w cyklu komórkowym, do naprawy DNA bądź do apoptozy. *3. Punkty kontrolne w cyklu komórkowym.* Sygnalizacja potrzebna do zatrzymania komórek w fazach G1, S lub G2 wychodzi od kinazy Atm, której najważniejszymi substratami są: kinazy efektorowe niezbędne we wszystkich 3 punktach kontrolnych, białko Tp53 działające jako czynnik transkrypcyjny, niezbędne do blokowania granicy faz G1/S, nibryna (punkt kontrolny S) oraz Brca1 (punkty kontrolne S i G2). Ostatnie 2 białka uczestniczą także w naprawie DNA. *4. Uwagi końcowe.* Badania nad układem nadzorującym genom ukazują obraz coraz bardziej złożony. Najczęściej opisane w komórkach ssaków funkcje tego układu – kontrola przechodzenia przez cykl komórkowy i jej koordynacja z naprawą DNA – zostały uzupełnione o kolejne, w znacznej mierze dzięki analizie tych samych funkcji u drożdży.

Słowa kluczowe: Układ nadzorujący genom; kinaza Atm; Tp53; Brca1; nibryna; cykl komórkowy.

Summary: 1 *Genome surveillance system and progression through the cell cycle.* Upon examination of cell cycle regulation relations were discovered of the cell cycle control mechanisms with a complicated web of signaling pathways, eventually called the genome surveillance system. 2 *Cellular response to*

*Praca była finansowana z działalności statutowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej.

http://rcin.org.pl

DNA damage. Protein components in the surveillance system that respond to DNA damage can be divided as follows: PIKL kinases (phosphatidyl inositol 3-kinase like); trimer-forming proteins similar to PCNA (proliferating cell nuclear antigen); sensor proteins (9-1-1 complex); serine-treonine (effector) kinases (Chk 1 and Chk 2); adaptor proteins. DNA damage generates an alarm signal through PIKL kinases and sensor proteins. The signal is amplified and transduced to recruit DNA repair systems and to activate transcription of genes necessary for blocking progression through the cell cycle, for DNA repair or apoptosis. 3. *Cell cycle checkpoints.* Signalling essential for blocking progression through G1, S and G2 phases starts at the Atm kinase; its downstream substrates are effector kinases, acting in all 3 checkpoints, Tp53, acting as transcription factor essential for G1/S block, nibrine (S phase checkpoint) and Brca1(checkpoints S and G2). The two latter proteins also participate in DNA repair. 4.*Concluding remarks.* Upon examination, the picture of the genome surveillance system becomes more and more complex. The functions best characterised in mammalian cells – control of cell cycle progression and its coordination with DNA repair – have been recently completed by new functions, mostly due to analysis of the same functions in yeast.

Key words: genome surveillance system; Atm kinase; Tp53; Brca1; nibrine; cell cycle.

1. WSTĘP

Każda komórka jest nieustannie narażona na czynniki środowiskowe uszkadzające DNA i hamujące replikację DNA. Ponadto błędy mogą powstać w normalnie zachodzących procesach replikacji i rekombinacji. Mechanizmem obronnym jest bardzo skomplikowana sieć dróg sygnalizacyjnych, zapewniająca skoordynowane uruchomienie procesów naprawy DNA i zatrzymanie przechodzenia komórki przez cykl komórkowy. Zapobiega to powieleniu uszkodzeń w procesie replikacji, a także przekazaniu uszkodzeń komórkom potomnym.

Przechodzenie komórki eukariotycznej przez cykl komórkowy można sobie wyobrazić jako ciąg zdarzeń w określonej kolejności aż do podziału na dwie komórki potomne. Jeżeli zdarzenie B może zajść pod warunkiem zakończenia zdarzenia A, zaś zależność taką znosi mutacja – mówimy o punkcie kontrolnym w części A → B przechodzenia przez cykl. Termin ten wprowadzili w 1988 roku Weinert i Hartwell [42]. Zdarzeniami, od których zależy kolejny krok komórki w cyklu, mogą być: synteza białek sygnalizacyjnych, ich modyfikacja posttranslacyjna, zmiana lokalizacji wewnątrzkomórkowej, synteza związków budulcowych (na przykład do replikacji DNA) oraz synteza *de novo* lub aktywacja enzymów niezbędnych do przeprowadzenia replikacji. W miarę badania regulacji cyklu komórkowego odkrywano powiązania mechanizmów regulacyjnych z wielką i skomplikowaną siecią dróg sygnalizacyjnych, którą nazwano układem nadzorującym genom (ang. *genome surveillance system*). Niektóre składniki tej sieci wykazują w rozwoju ewolucyjnym zadziwiającą zachowawczość budowy. Dzięki temu, szczegółowe badania na drożdżach niezwykle ułatwiły przeprowadzenie późniejszego doświadczenia na komórkach zwierzęcych [21].

http://rcin.org.pl

2. UKŁAD NADZORUJĄCY GENOM A PRZECHODZENIE PRZEZ CYKL KOMÓRKOWY

Najprościej można powiedzieć, że podstawowym celem układu nadzorującego genom jest zapewnienie wiernego przekazu komórkowej informacji genetycznej komórkom potomnym. Zależy ono od szeregu warunków [47], takich jak:

- wierność replikacji,
- dokładny podział chromosomów między komórki potomne,
- zminimalizowanie skutków uszkodzeń DNA zachodzących pod wpływem czynników wewnętrznych i zewnętrznych.

Wymaga to monitorowania struktury DNA i stanu wrzeciona mitotycznego, a także koordynacji naprawy DNA i przechodzenia przez cykl. Początkowo uważano, że rolą układu nadzorującego jest pozostawienie czasu na naprawę DNA przed jego replikacją lub podziałem między komórki potomne. Obecnie traktuje się mechanizmy kontroli przechodzenia przez cykl komórkowy jako składnik odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA [17, 47]. Na odpowiedź tę składa się działanie skomplikowanej sieci sygnalizacyjnej prowadzące do aktywacji różnych grup genów, aktywacji naprawy DNA, zatrzymania w cyklu komórkowym lub apoptozy.

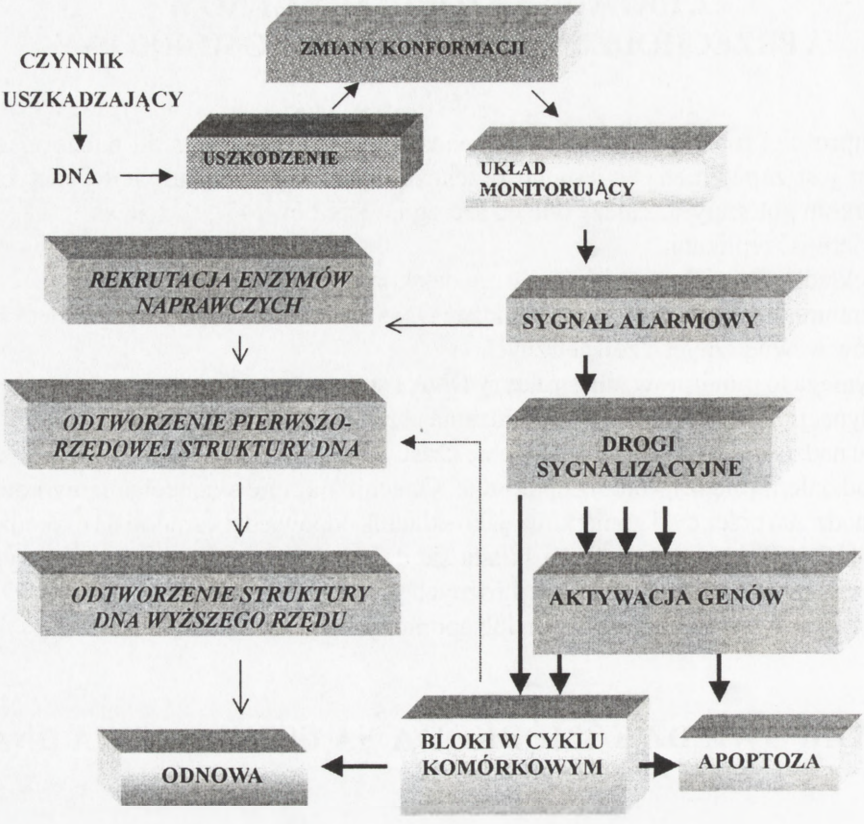
3. ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWA NA USZKODZENIA DNA

3.1. Sygnał alarmowy

Rycina 1 przedstawia bardzo ogólny schemat zdarzeń zachodzących po uszkodzeniu DNA. Sposób, w jaki układ monitorujący generuje sygnał alarmowy, jest ciągle niedostatecznie poznany. Najprostsze jest przypuszczenie, że powstanie każdego rodzaju uszkodzenia – pęknięcia pojedynczo- lub podwójnoniciowego, uszkodzenia oksydacyjnego zasady lub jej alkilacji – pociąga za sobą zmianę konformacji chromatyny. Zakładamy, że na taką zmianę reagują białka czujnikowe. Podobnie – zatrzymanie przesuwania się widełek replikacyjnych z powodu zawady przestrzennej stanowi źródło sygnału alarmowego.

Sygnał alarmowy uruchamia dwa ciągi zdarzeń (przegląd w [35]), zaznaczone na rycinie 1 strzałkami różnej grubości. Jeden z nich prowadzi do rekrutacji enzymów naprawczych i białek pomocniczych do miejsc uszkodzonych i do naprawy uszkodzeń, czyli do przywrócenia pierwotnej struktury pierwszorzędowej DNA. W przypadku niektórych typów uszkodzeń towarzyszy temu znaczna reorganizacja struktury chromatyny w obszarze sąsiadującym z uszkodzeniem. Jednym z najwcześniejszych zdarzeń po powstaniu pęknięcia podwójnoniciowego jest fosforylacja histonu H2AX [30]. Okazało się, że zmiana ta obejmuje obszar 0,03% chromatyny na jedno pęknięcie

http://rcin.org.pl



RYCINA 1. Dwa ciągi zdarzeń zapoczątkowywanych przez uszkodzenie DNA: uruchomienie układów naprawy i aktywacja genów, których produkty białkowe przeprowadzają zatrzymanie komórek w cyklu komórkowym i odnowę lub apoptozę (zmodyfikowane według [35])

podwójnoniciowe, a zatem – w przeciętnej komórce ssaka – obszar odpowiadający 1–2 mega par zasad [31]. W miejscu tym pojawiają się kolejno białka pomocnicze i enzymy naprawy DNA tworząc ogniska, widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym po zastosowaniu odpowiednich przeciwciał [27]. Po dokonaniu naprawy następuje przywrócenie struktury DNA wyższego rzędu. Jest to warunek konieczny, ale niewystarczający do zapewnienia odnowy komórkowej, inaczej mówiąc – do tego, aby komórka przeżyła i była zdolna do prawidłowego podziału.

Drugi ciąg zdarzeń prowadzi przez układ sygnalizacyjny do aktywacji czynników transkrypcyjnych. Zapewnia to transkrypcję odpowiednich grup genów i syntezę nowych białek. Zależnie od tego, jaki obrót przybiera kierunek sygnałów – są to białka zatrzymujące przechodzenie przez cykl komórkowy lub w inny sposób wspomagające procesy naprawy i odnowy albo też uruchamiające procesy prowadzące do śmierci, często przez apoptozę.

http://rcin.org.pl

Jakkolwiek układ nadzorujący kieruje sygnały zarówno do układów naprawy DNA, jak i do punktów kontrolnych – obserwacje doświadczalne wskazują na częściową niezależność obu opisanych ciągów zdarzeń w pewnych warunkach: na przykład brak histonu H2AX zatrzymuje samoorganizację ognisk naprawczych, natomiast nie zakłóca mechanizmów blokujących przechodzenie przez cykl komórkowy [6].

Uszkodzenia DNA przypisywano dawniej głównie czynnikom zewnętrznym, zaś badaniem ich charakteru i naprawy zajmowały się dziedziny niezbyt popularne – radio- i fotobiologia. Okazało się jednak, że – zwłaszcza pod wpływem endogennie generowanych (w normalnym metabolizmie komórki) aktywnych form tlenu – powstawanie uszkodzeń DNA zachodzi bardzo często [3]. Dane liczbowe zawarto w tabeli 1. Spośród czynników endogennych najsilniej działa rodnik hydroksylowy, powstający z nadtlenku wodoru w reakcji Fentona katalizowanej przez jony metali przejściowych. Źródłem uszkodzeń są także błędy w replikacji i rekombinacji. Biorąc pod uwagę częstość zdarzeń prowadzących do uszkodzenia DNA można uznać, że naprawa DNA należy do procesów kluczowych dla organizmów żywych.

TABELA 1. "Spontaniczne" uszkodzenia DNA (zachodzące pod wpływem czynników endogennych i w "normalnym" środowisku) według Billena [3]

Rodzaj uszkodzenia	Liczba indukowana w jednej komórce w ciągu godziny
Utrata reszty purynowej	1 500
Inne uszkodzenia zasad	1 500
Pęknięcia pojedynczoniciowe	5 000
Wszystkie uszkodzenia	Ok. 8 000

3. 2. Typy białek w układzie nadzorującym odpowiadających na uszkodzenia DNA

Białka wchodzące w skład układu nadzorującego stan genomu, których funkcją jest reagowanie na uszkodzenia DNA – są najlepiej poznane u drożdży *Saccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae*. W komórkach ssaków w wielu przypadkach poszukuje się analogii do mechanizmów poznanych u drożdży. Istotnie, w wielu białkach – składnikach układu nadzorującego występuje bardzo znaczny konserwatyzm struktury pierwszorzędowej, a także funkcji.

Melo i Toczyski [21] dzielą białka układu odpowiedzi na uszkodzenia DNA na cztery grupy:

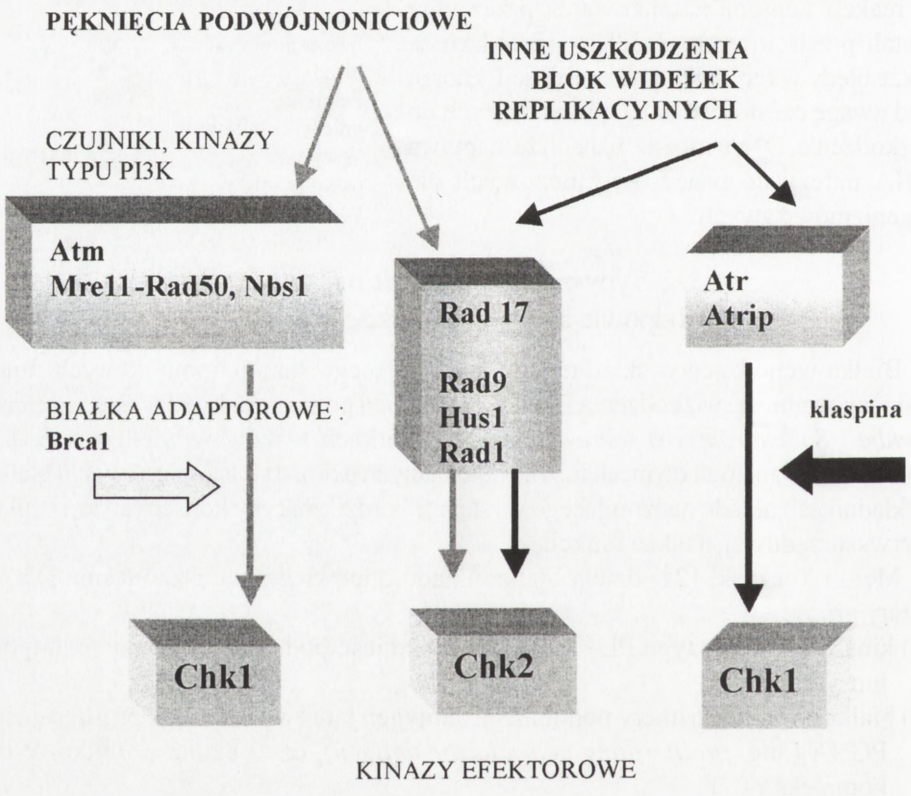
(1) kinazy białkowe typu PI3K-like (PIKL), to jest, podobne do kinazy fosfatydylo-inozytolu;
(2) białka tworzące trimery podobnie jak antygen jądrowy komórek proliferujących, PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*), czyli białka czujnikowe (tzw. kompleks 9-1-1);
(3) kinazy serynowo-treoninowe (Chk 1 i Chk 2), tzw. kinazy efektorowe;
(4) białka adaptorowe (klaspina i Brca1).

http://rcin.org.pl

Podobnie klasyfikują te białka O'Connell i wsp. [20]. Białka adaptorowe zawierają sekwencję BRCT (ang. *Brca1 C-terminus*) służącą oddziaływaniom białko-białko, zatem należałoby do nich być może zaliczyć także białko 53BP1, którego funkcje są dopiero identyfikowane [29]. Należy dodać, że – zależnie od rodzaju źródła sygnału alarmowego – reagują na uszkodzenie DNA różne zestawy białek. Ilustruje to rycina 2 na przykładzie komórek ludzkich. Na przykład na uszkodzenia indukowane przez nadfiolet odpowiada kinaza Atr i kinaza efektorowa Chk1, zaś na pęknięcia podwójnoniciowe po napromienieniu promieniowaniem X – kinaza Atm i kinaza efektorowa Chk2. W obu przypadkach sygnał dociera do Tp53, lecz cząsteczka podlega fosforylacji w różnych miejscach, stosownie do pełnionej potem funkcji.

3.3. Kompleks nadzorujący

Nie ma jednolitego stanowiska co do charakteru kompleksu monitorującego stan DNA jądrowego w komórkach ssaków. Według Wanga i współpr. [40] istnieje wielki kompleks („superkompleks") złożony z „subkompleksów" (a te z kolei z wielu białek), nazywany BASC (ang. *BRCA1-associated surveillance complex*). Skład kompleksu,



RYCINA 2. Schemat dwóch szlaków sygnalizacji uszkodzeń DNA prowadzących do punktów kontrolnych cyklu komórkowego zależnie od źródła sygnału, oparty na danych z pracy Melo i Toczyskiego [21]

http://rcin.org.pl

TABELA 2. Dotychczas zidentyfikowane białka wchodzące w skład kompleksu BASC (ang. *BRCA1-associated genom surveillance complex*) wg Wanga i współpr.[40]

Akronim	Charakter i funkcja
Atm	kinaza typu PIKL, zmutowana w AT(ang. *ataxia telangiectasia (AT) mutated*)
Atr	kinaza typu PIKL, zbliżona do Atm i Rad3 (ang.*Atm-Rad3-related)*
Nbs1	nibryna, białko zmutowane w zespole kruchości chromosomów z Nijmegen, składnik kompleksu Mre11-Rad50-Nbs1, działającego w naprawie DNA
Mre11, Rad 50	składniki kompleksu Mre11-Rad50-Nbs1, działającego w naprawie pęknięć podwójnoniciowych DNA
BLM	Helikaza zmutowana w zespole Blooma
Msh2/6, Mlh2	Białka układu naprawy błędnie sparowanych zasad
Brca1	Białko zmutowane w raku piersi i jajników
RFC	Czynnik replikacyjny C, wspomagający rekrutację PCNA przy replikacji DNA przez polimerazę δ
?	Białka niezidentyfikowane obecne w kompleksie

określony na podstawie immunoprecypitacji i spektrometrii masowej, podano w tabeli 2. Wielu autorów uważa jednak, że istnieje system niezależnej rekrutacji do miejsca uszkodzenia pojedynczych białek i dwóch mniejszych kompleksów (przegląd w [21, 24, 49]), w tym kinazy Atm, kompleksu 9-1-1 i kompleksu Atr-Atrip. Te dwa kompleksy z komórek ssaków odpowiadają w *S. pombe* kompleksom Rad 9-Hus 1-Rad 1 i Rad3-Rad 26 [21, 43].

Kompleks 9-1-1 został scharakteryzowany stosunkowo niedawno [5, 16, 33, 34, 37]. Działa on w sposób nie do końca wyjaśniony. Strukturalnie jest on podobny do PCNA, tworzącego przesuwającą się po DNA obejmę i rekrutowanego z pomocą czynnika replikacyjnego C (RFC, ang. *replication factor C*) złożonego z jednej dużej (RFC1) i czterech małych podjednostek. Analogicznie, kompleks 9-1-1 zostaje sprowadzony do uszkodzonego miejsca przez kompleks złożony z Rad 17 (podobny do RFC1) i małych podjednostek RFC (przegląd w [24, 49]). Ten sposób działania został zaproponowany na podstawie podobieństwa w składnikach kompleksów replikacyjnego i 9-1-1.

Rad 9 podlega w nieuszkodzonej komórce wielomiejscowej fosforylacji przez nie do końca poznane kinazy, a także hiperfosforylacji w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Kinazą modyfikującą Rad 9 u ssaków (podobnie jak Rad17 [1]) jest przypuszczalnie Atm [7]. Ufosforylowanie Rad 9 nie zmienia stabilności wiązania z Rad 1 i Hus 1 [37], służy zatem zapewne innym celom. Aktywność egzonukleazy 3'–5' [2] dała podstawę do spekulacji, że Rad9 powiększa wykryte pęknięcie DNA i w ten sposób wzmacnia sygnał alarmowy [37].

http://rcin.org.pl

4. PUNKTY KONTROLNE W CYKLU KOMÓRKOWYM

Punktom kontrolnym w cyklu komórkowym poświęcona jest praca przeglądowa [12] niedawno publikowana w Postępach Biologii Komórki. Z tego względu, poniższy, dość pobieżny przegląd ogranicza się do najważniejszych aspektów regulacji, które związane są bezpośrednio z układem nadzorującym genom i całkowicie pomija punkty kontrolne w mitozie. Czytelników zainteresowanych bardziej szczegółowym omówieniem tego tematu odsyłam zatem do pracy [12].

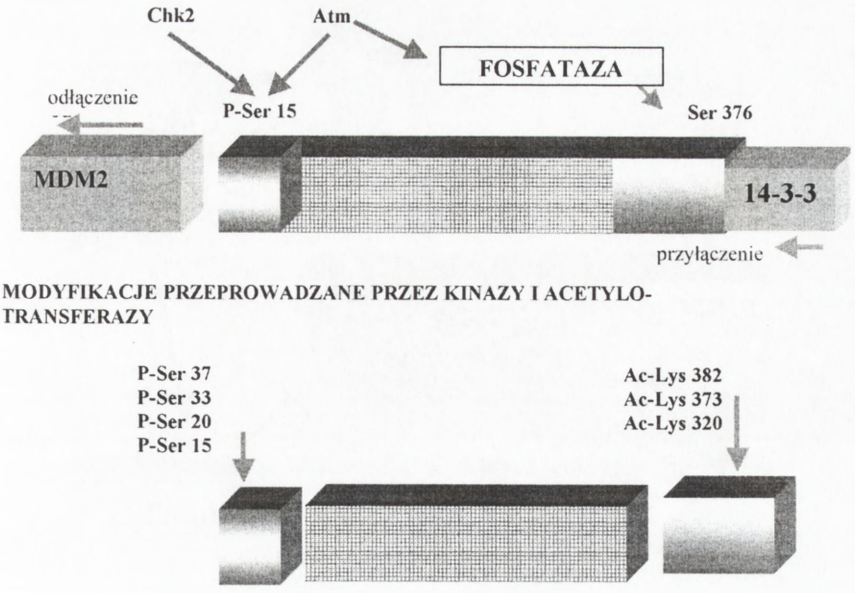
4.1. Punkt kontrolny G_1/S

Komórka z DNA uszkodzonym w czasie przechodzenia przez fazę G1 zostaje przez układ nadzorujący zatrzymana na granicy faz G_1/S. Zapobiega to replikowaniu uszkodzeń w trakcie syntezy DNA. Mechanizm tego zdarzenia został dobrze opisany w komórkach ssaków poddanych napromieniowaniu promieniowaniem X lub γ. Kluczową rolę pełni w nim białko Tp53 (*tumor supressor protein 53*; przegląd w [13, 14]). Jego budowę i modyfikacje posttranslacyjne następujące po uszkodzeniu DNA schematycznie przedstawiono na rycinach 3 i 4.

Pęknięcie jedno- lub dwuniciowe DNA aktywuje kinazę Atm. Sposobu aktywacji nie znamy; zakładany jest w nim udział białek czujnikowych na zasadzie spodziewanych podobieństw w mechanizmach działających u drożdży i w organizmach na wyższych szczeblach rozwoju ewolucyjnego. Atm fosforyluje następnie histon H2AX [4] oraz białko Tp53 [22]. Pociąga to za sobą liczne następstwa. Chromatyna wokół uszkodzenia zmienia konformację. Tp53 przestaje być wiązane przez Mdm2, ligazę ubikwitynową, która w komórce nieuszkodzonej wprowadza Tp53 na drogę degradacji. To powoduje stabilizację i szybki przyrost ilości Tp53, zaś pozostałe modyfikacje posttranslacyjne (por. ryc. 4) umożliwiają tetrameryzację i wystąpienie Tp53 w roli czynnika transkrypcyjnego. Jest to kluczowe zdarzenie w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, stąd Tp53 jest chętnie nazywane strażnikiem genomu. Ostatnio stwierdzono, że do uzyskania stabilizacji Tp53 i niektórych jego funkcji niezbędna jest jeszcze aktywacja przez kinazę Chk2 [15, 36] oraz białko wiążące, oznaczone symbolem 53BP1 [29]. Jest ono fosforylowane przez Atm podobnie jak Tp53 i gromadzi się w ogniskach naprawy, wspomnianych uprzednio, wcześniej niż Brca1, w sposób od fosforylacji

RYCINA 3. Domeny wyróżniane w cząsteczce Tp53 (na podstawie danych w [13, 14])

http://rcin.org.pl



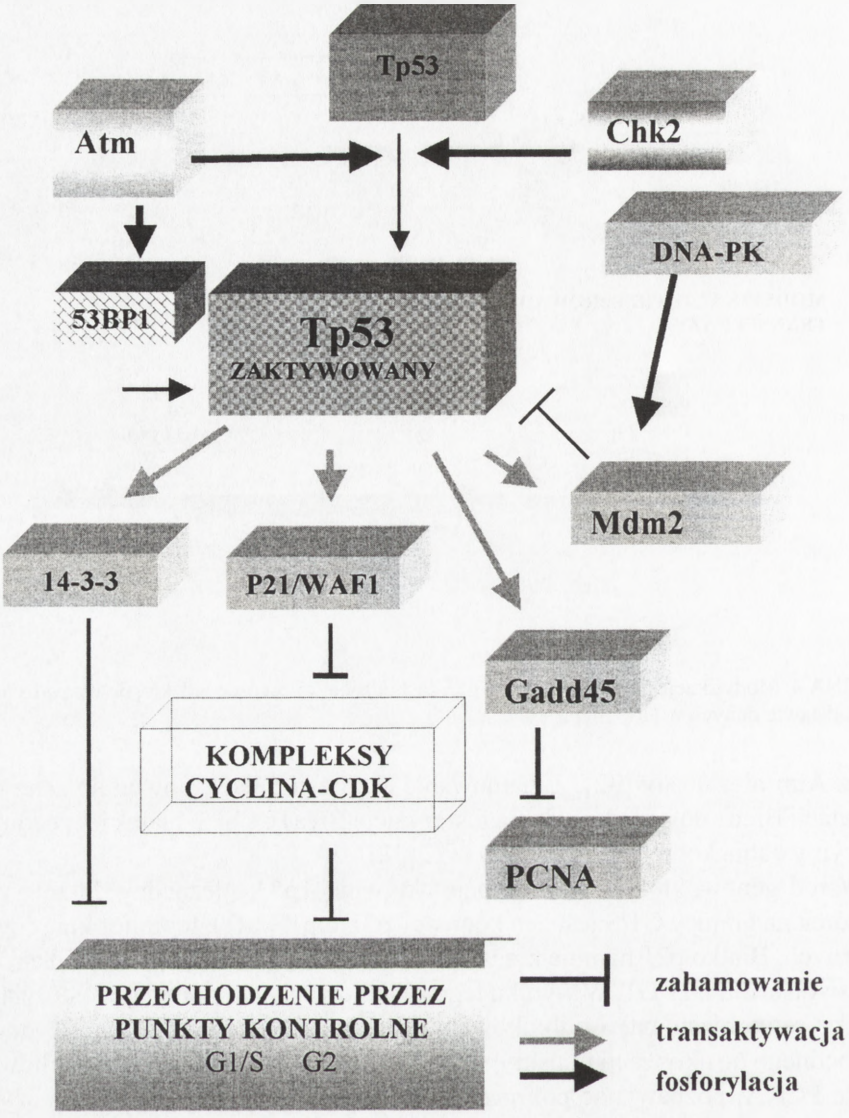
RYCINA 4. Modyfikacje posttranslacyjne Tp53 zachodzące w komórce ludzkiej po uszkodzeniu DNA (na podstawie danych w [13, 14])

przez Atm niezależny [32]. Zahamowanie ekspresji 53BP1 powoduje zatrzymanie rekrutacji Brca1 do ognisk i osłabia fosforylację Brca1 i Chk2, białek niezbędnych do zatrzymywania komórek w fazach S i G2 [38].

Wśród genów, których transkrypcję aktywuje Tp53, niezbędny do zatrzymania komórek na granicy G1/S jest gen kodujący p21(cip1/waf1), inhibitor kinaz cyklinozależnych. Białko p21 hamuje kinazy cyklinozależne (Cdk/cyklina E, Cdk4/cyklina D1) swoiste dla fazy G1. W wyniku tego zahamowania nie następuje fosforylacja Rb (białko retinoblastoma) i odblokowanie funkcji E2F, czynnika transkrypcyjnego niezbędnego do aktywacji transkrypcji genów swoistych dla fazy S. Dodatkowo, p21 wiąże PCNA, pozbawiając polimerazę DNA-δ współdziałającego z nią czynnika. Zdarzenia te podsumowuje schemat na rycinie 5 (przegląd w [13,14]).

Są także inne geny, których transkrypcja podlega aktywacji lub hamowaniu przez Tp53. Jest to m.in. grupa genów kontrolujących proces apoptozy, bardzo istotna dla organizmu. Przyjmuje się, że przy niedostatecznie szybkiej lub skutecznej naprawie uszkodzeń uruchamiany jest program prowadzący do eliminacji uszkodzonych komórek. Zazwyczaj zdolność tę tracą komórki w procesie nowotworzenia. Zdarza się, że „sygnał śmierci" wysyłany jest wcześnie, mimo że naprawa DNA jest „na dobrej drodze" i może doprowadzić do odtworzenia struktury pierwszorzędowej DNA. Komórki o takich właściwościach są nadwrażliwe na czynniki uszkadzające DNA, chociaż nie występują w nich defekty układów naprawy [28]. Sygnał śmierci jest też często wysyłany wtedy,

http://rcin.org.pl



RYCINA 5. Indukowane przez uszkodzenia DNA sygnały przechodzące przez Tp53 i regulujące przechodzenie przez cykl komórkowy (na podstawie danych w [13, 14])

http://rcin.org.pl

gdy nie zadziała mechanizm zatrzymujący w punkcie kontrolnym; przykładem może być komórka poddana po napromienieniu działaniu kofeiny, znoszącej blok w fazie G2 wskutek zahamowania kinaz typu PIKL.

4.2. Punkt kontrolny S

Podobnie jak inne punkty kontrolne, punkt w fazie S najstaranniej był badany w komórkach zwierzęcych poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Replikacja DNA zatrzymuje się w ciągu paru minut po ekspozycji. Zależność % zahamowania od dawki jest dwufazowa – początkowo gwałtownie spada, co jest wynikiem zahamowania inicjacji replikacji, potem spadek jest powolny, co odpowiada zahamowaniu elongacji w replikonach, które już rozpoczęły replikację [26, 41]. W latach siedemdziesiątych uważano, że jest to bezpośrednie następstwo uszkodzenia DNA. Stopniowo gromadzono dowody wskazujące, że zahamowanie to jest wynikiem działania mechanizmów regulacyjnych. Rozstrzygające było doświadczenie Wanga [39], który stwierdził, że ekstrakty z komórek kontrolnych replikowały plazmidowy DNA w układzie bezkomórkowym, zaś ekstrakty z napromieniowanych komórek nie prowadziły replikacji. Sam plazmid nie był napromieniowany, a zatem nie zawierał żadnych uszkodzeń, które mogłyby hamować replikację.

Obecne badania przyczyniają się przede wszystkim do ustalenia listy białek, których aktywność jest niezbędna do zahamowania replikacji po uszkodzeniu DNA. Listę tę otwiera Atm. Promieniooporna synteza DNA jest jedną z charakterystycznych i wcześnie odkrytych cech komórek AT [25]. Działanie Atm uzupełnia cytoplazmatyczna kinaza II zależna od kalmoduliny [9], a także Ku80, podjednostka kinazy zależnej od DNA, czynnej w układzie niehomologicznego łączenia pęknięć podwójnoniciowych [48]. Dwa inne białka, nibryna [11] i Brca1 [45, 46], są podobnie jak Atm składnikami układu nadzorującego genom, jednocześnie zaś uczestniczą w procesach naprawy DNA. Nibryna jest substratem dla Atm, ale także aktywuje fosforylację niektórych substratów Atm [11]; ponadto jako składnik tzw. kompleksu MRN (Mre11-Rad50-nibryna) uczestniczy w naprawie homologicznej i niehomologicznym łączeniu pęknięć podwójnoniciowych DNA. Podobnie, Brca1 jest składnikiem kompleksu BASC i substratem dla Atm; stwierdzono jego udział w naprawie pęknięć podwójnoniciowych [50], a także działanie w charakterze koaktywatora transkrypcji genów naprawy DNA i regulacji cyklu komórkowego [18]. Na podstawie analogii z regulacją fazy S u drożdży [19] oraz badań Falcka i współpr. [10] przyjmuje się, że niezbędne dla działania punktu kontrolnego w fazie S są Rad17 i kinaza efektorowa Chk2 (por. ryc. 2 i 6). Pomimo tych wiadomości brak jest spójnego modelu działania punktu kontrolnego w fazie S.

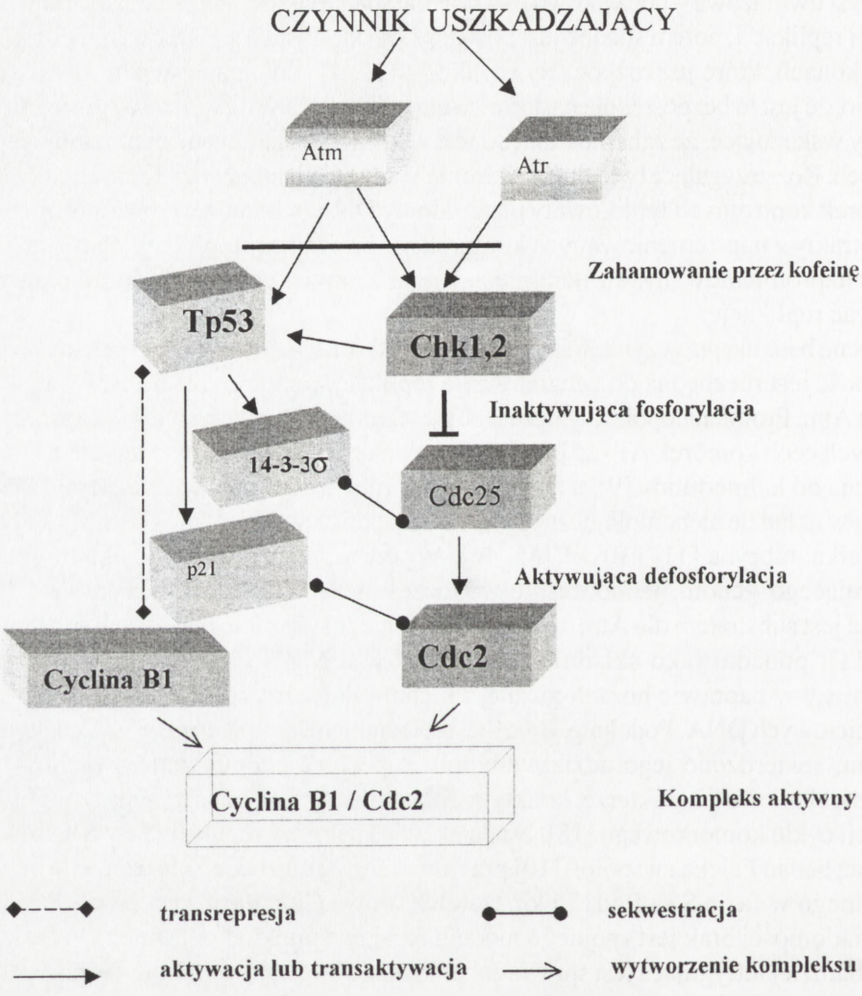
Najbardziej intrygująca jest sprawa zahamowania inicjacji replikonów w przypadku naruszenia ciągłości nici DNA. Wiadomo, że w telofazie [8] replikony otrzymują tzw. licencję na jednorazową replikację w następnej interfazie, przez przyłączenie do miejsc *ori* kompleksów pre-replikacyjnych (m.in. białek Cdc6, Cdt1 i Mcm2-7). Są one blokowane przez kinazy cyklinozależne i geminininę, niewielkie białko, które jest inhibitorem inicjacji replikacji (przegląd w [23] . Ponieważ geminina przeciwdziała nielicencjonowanemu, powtórnemu replikowaniu DNA, można ją uznać za czynnik

http://rcin.org.pl

przeciwdziałający niestabilności genetycznej. Znacząca dla domysłów co do wzajemnych oddziaływań gemininy i składników układu nadzorującego jest obserwacja [20] obniżania aktywności kinazy efektorowej Chk1 przez geminię.

4.3. Punkt kontrolny G2

Komórka z DNA uszkodzonym w czasie trwania fazy G2 lub z DNA uszkodzonym i nienaprawionym we wcześniejszych fazach cyklu komórkowego zostaje przez układ nadzorujący zatrzymana w fazie G2. Zapobiega to przekazywaniu uszkodzeń materiału



RYCINA 6. Sygnalizacja związana z zatrzymaniem w fazie G2 komórek z uszkodzonym DNA (na podstawie danych w [13, 14, 24])

http://rcin.org.pl

genetycznego do komórek potomnych. Białko Tp53 pełni w bloku G2 pomocniczą rolę – główny szlak sygnalizacji przebiega od kinaz typu PIKL. Proporcje udziału obu szlaków zależą od typu komórek.

Przebieg sygnalizacji przedstawiono w sposób uproszczony na rycinie 6. Zawiera ona dobrze znane informacje o sekwestracji fosfatazy Cdc25 przez białko 14-3-3σ, zaś kinazy Cdc2 przez p21; ponadto Tp53 powoduje represję syntezy cykliny B1. Za najważniejszą część mechanizmu zatrzymującego komórkę w fazie G2 uważa się zahamowanie kinazy Cdc2 występującej w kompleksie z cykliną B1. Do jej aktywności konieczna jest defosforylacja tyrozyny 15. Fosforylacja tej reszty tyrozynowej utrzymywana jest przez okres trwania bloku G2, to jest tak długo, jak długo od kinaz Atm i Atr nadchodzą sygnały o nieciągłości nici DNA lub obecności innych uszkodzeń DNA. Aktywacja kinaz Chk powoduje z kolei fosforylację fosfatazy Cdc25, co hamuje jej aktywność, sprzyja wiązaniu z 14-3-3 i zatrzymaniu fosfatazy w cytoplazmie. Cdc25 jest aktywatorem Cdc2/B1 (wspomniana powyżej defosforylacja tyrozyny 15) (przegląd w [24]).

Stosunkowo niedawno poznanym u ssaków, a niezbędnym elementem regulacji bloku G2 jest udział w aktywacji kinaz Chk białka Rad17 i kompleksu 9-1-1 (por. ryc. 2), wcześniej scharakteryzowany u drożdży [24].

Skrócenie okresu trwania bloku G2 w komórkach uszkodzonych przez promieniowanie jonizujące powoduje wejście ich w apoptozę albo przedwczesną mitozę; w tym ostatnim przypadku można zaobserwować aberracje chromosomowe, co pociąga to za sobą śmierć w kolejnej interfazie, stąd promieniouczulające działanie czynników skracających blok G2, m.in. kofeiny, inhibitora Atm i Atr. Jak się wydaje, efekt taki zależy od tego, czy komórki dysponują sprawnymi procesami naprawy działającymi w fazach G1 i S. Jeżeli docierają one do fazy G2 z niewielką ilością uszkodzeń, to skrócenie bloku w niewielkim stopniu wpływa na ich przeżywalność. Znaczne skrócenie lub brak bloku G2 obserwowano w komórkach ze zmutowanym Brca1, brak jednak wiadomości o mechanizmie tego działania [45].

5. UWAGI KOŃCOWE

Badania ostatnich 20 lat z coraz większą precyzją wskazywały na związek między chorobami nowotworowymi a zaburzeniami funkcji układu nadzorującego genom, ukazując obraz coraz bardziej złożony. Najczęściej opisane w komórkach ssaków funkcje tego układu – kontrola przechodzenia przez cykl komórkowy i jej koordynacja z naprawą DNA – zostały uzupełnione o kolejne, w znacznej mierze dzięki analizie tych samych funkcji u drożdży. Jedna z nowszych prac przeglądowych [47] wylicza jako funkcje układu nadzorującego genom: aktywację szlaków naprawy DNA, rekrutację białek naprawczych do miejsc uszkodzonych, kontrolę składu chromatyny telomerów i długości telomerów, a także aktywację transkrypcji różnych grup genów, w tym uruchomienie programu śmierci przez apoptozę. W tej dziedzinie, zwłaszcza w kontekście znajomości budowy genomu ludzkiego, pozostało wiele do zrobienia.

http://rcin.org.pl

LITERATURA

[1] BAO S, TIBBETTS RS, BRUMBAUGH KM, FANG Y, RICHARDSON DA, ALI A, CHEN SM, ABRAHAM RT, WANG XF. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* 2001; **411**: 969–974.

[2] BESSHO T, SANCAR A. Human DNA damage checkpoint protein hRAD9 is a 3' to 5' exonuclease. *J Biol Chem* 2000; **275**: 7451–7454

[3] BILLEN D. Spontaneous DNA damage and its significance for the „negligible dose" controversy in radiation protection. *Radiat Res* 1990; **124** (2): 242–245.

[4] BURMA S, CHEN BP, MURPHY M, KURIMASA A, CHEN DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2002; **276**: 42462–42467.

[5] BURTELOW MA, ROOS-MATTJUS PM, RAUEN M, BABENDURE JR, KARNITZ LM. Reconstitution and molecular analysis of the hRad9-hHus1-hRad1 (9-1-1) DNA damage responsive checkpoint complex. *J Biol Chem* 2001; **276**: 25903–25909.

[6] CELESTE A, PETERSEN S, ROMANIENKO PJ, FERNANDEZ-CAPETILLO O, CHEN HT, SEDELNIKOVA OA, REINA-SAN-MARTIN B, COPPOLA V, MEFFRE E, DIFILIPPANTONIO MJ, REDON C, PILCH DR, OLARU A, ECKHAUS M, CAMERINI-OTERO RD, TESSAROLLO L, LIVAK F, MANOVA K, BONNER WM, NUSSENZWEIG MC, NUSSENZWEIG A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002; **296**: 922–927.

[7] CHEN MJ, LIN YT, LIEBERMAN HB, CHEN G, LEE EY. ATM-dependent phosphorylation of human Rad9 is required for ionizing radiation-induced checkpoint activation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 16580–16586.

[8] DIMITROVA DS, PROKHOROVA TA, BLOW JJ, TODOROV IT, GILBERT DM. Mammalian nuclei become licensed for DNA replication during late telophase. *J Cell Sci* 2002; **115**(Pt 1): 51–59.

[9] ENNS L, MURRAY D, MIRZAYANS R. Effects of the protein kinase inhibitors wortmannin and KN62 on cellular radiosensitivity and radiation-activated S phase and G1/S checkpoints in normal human fibroblasts. *Br J Cancer* 1999; **81**: 959–965.

[10] FALCK J, MAILAND N, SYLJUASEN RG, BARTEK J, LUKAS J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001; **410**: 842–847.

[11] GIRARD PM, RIBALLO E, BEGG AC, WAUGH A, JEGGO PA. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene* 2002; **21**: 4191–4199.

[12] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Punkty kontrolne cyklu komórkowego – czy znamy ich molekularne podłoże? *Post Biol Kom* 2002; **29**: 157–175.

[13] HARRIS CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ Health Perspect* 1996; **104** Suppl 3: 435–439.

[14] HUPP TR, LANE DP, BALL KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* 2000; **352** Pt 1: 1–17.

[15] HIRAO A, CHEUNG A, DUNCAN G, GIRARD PM, ELIA AJ, WAKEHAM A, OKADA H, SARKISSIAN, T, WONG JA, SAKAI T, DE STANCHINA E, BRISTOW RG, SUDA T, LOWE SW, JEGGO PA, ELLEDGE SJ, MAK TW. Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6521–6532.

[16] LINDSEY-BOLTZ LA, BERMUDEZ VP, HURWITZ J, SANCAR A. Purification and characterization of human DNA damage checkpoint Rad complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 11236–11241.

[17] LOWNDES N, MURGUIA JR. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opinion Genet Dvelop* 2000; **10**: 17–25.

[18] MACLACHLAN TK, TAKIMOTO R, EL-DEIRY WS. BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 4280–4292.

[19] MARTINHO RG, LINDSAY HD, FLAGGS G, DEMAGGIO AJ, HOEKSTRA MF, CARR AM, BENTLEY NJ. Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses. *EMBO J* 1998; **17**: 7239–7249.

[20] MCGARRY TJ. Geminin deficiency causes a Chk1-dependent G2 arrest in *Xenopus*. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 3662–3671.

[21] MELO J, TOCZYSKI D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opinion Cell Biol* 2002; **14**: 237–245.

http://rcin.org.pl

[22] NAKAGAWA K, TAYA Y, TAMAI K, YAMAIZUMI M. Requirement of ATM in phosphorylation of the human p53 protein at serine 15 following DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 1999;**19**: 2828–2834.
[23] NISHITANI H, LYGEROU Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* 2002; **7:** 523–534.
[24] O'CONNELL MJ, WALWORTH NC, CARR AM. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 296–303.
[25] PAINTER RB. Radioresistant DNA synthesis: an intrinsic feature of ataxia telangiectasia. *Mutat Res* 1981; **84**: 183–190.
[26] PAINTER RB, YOUNG BR. X-ray induced inhibition of DNA synthesis in Chinese hamster ovary, human HeLa and mouse L cells. *Radiat Res* 1975; **64**: 648–656.
[27] PAULL TT, ROGAKOU EP, YAMAZAKI V, KIRCHGESSNER CU, GELLERT M, BONNER WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000; **10**: 886–895.
[28] RADFORD IR, MURPHY TK. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int J Radiat Biol* 1994; **65**: 229–239.
[29] RAPPOLD I, IWABUCHI K, DATE T, CHEN J. Tumor suppresor p53 binding protein 1 (53BP2) is involved in DNA-damage signaling pathways. *J Cell Biol* 2001; **153**: 613–620.
[30] ROGAKOU EP, PILCH DR, ORR AH, IVANOVA VS, BONNER WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5858–5868.
[31] ROGAKOU EP, BOON C, REDON C, BONNER WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* 1999; **146**: 905–916.
[32] SCHULTZ LB, CHEHAB NH, MALIKZAY A, HALAZONETIS TD. P53 Binding Protein (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double strand breaks. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1381–1390.
[33] ST ONGE RP, UDELL CM, CASSELMAN R, DAVEY S. The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 1985–1995.
[34] ST ONGE RP, BESLEY BD, PARK M, CASSELMAN R, DAVEY S. DNA damage-dependent and -independent phosphorylation of the hRad9 checkpoint protein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 41898–41905.
[35] SZUMIEL I. Monitoring and signalling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res* 1998; **150** (Suppl): s92–s101.
[36] TAKAI H, NAKA K, OKADA Y, WATANABE M, HARADA N, SAITO S, ANDERSON CW, APPELLA E, NAKANISHI M, SUZUKI H, NAGASHIMA K, SAWA H, IKEDA K, MOTOYAMA N. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J* 2002; **21**: 5195–5205.
[37] VOLKMER E, KARNITZ LM. Human homologs of *Schizosaccharomyces pombe* Rad1, Hus1, and Rad9 form a DNA damage-responsive protein complex. *J Biol Chem* 1999; **274**: 567–570.
[38] WANG B, MATSUOKA S, CARPENTER PB, ELLEDGE SJ. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 2002 Oct 3; [epub ahead of print].
[39] WANG Y. Regulation of DNA replication in irradiated cells by trans-acting factors. *Radiat Res* 1995; **142**: 169–175.
[40] WANG Y, CORTEZ D, YAZDI P, NEFF N, ELLEDGE SJ, QIN J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000; **14**: 927–939.
[41] WATANABE I. Radiation effects on DNA chain growth in mammalian cells. *Radiat Res* 1974; **58**: 541–556.
[42] WEINERT TA, HARTWELL LH. Characterization of RAD9 of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 6554–6564.
[43] WEISS RS, MATSUOKA S, ELLEDGE SJ, LEDER P. Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway. *Curr Biol* 2002 **12**: 73–77.
[44] WILLERS H, MCCARTHY EE, WU B, WUNSCH H, TANG W, TAGHIAN DG, XIA F, PO WELL SN. Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene* 2000; **19**: 632–639.

http://rcin.org.pl

[45] XU B, KIM ST, KASTAN MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 3445–3450.
[46] XU B, O'DONNELL AH, KIM ST, KASTAN MB. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* 2002; **62**: 4588–4591.
[47] ZHOU BB, ELLEDGE SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; **408**: 433–439.
[48] ZHOU XY, WANG X, WANG H, CHEN DJ, LI GC, ILIAKIS G, WANG Y. Ku affects the ATM-dependent S phase checkpoint following ionizing radiation. *Oncogene* 2002; **21**: 6377–6381.
[49] ZOU L, CORTEZ D, ELLEDGE SJ. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* 2002; **16**: 198–208.
[50] ZHONG Q, CHEN CF, CHEN PL, LEE WH. BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 2002; **277**: 28641–28647.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 25.02.2002 r.
Przyjęto: 06.01.2003 r.
Dorodna 16, 03-195 Warszawa

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (375–381)

IMPLANTACJA ZARODKA

EMBRYO IMPLANTATION

Rafał KURZAWA, Andrzej STARCZEWSKI, Tomasz BĄCZKOWSKI

Klinika Rozrodczości i Ginekologii, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

Streszczenie: W pracy przedstawiono zjawisko implantacji. Omówiono mechanizmy poszczególnych jej etapów: apozycji, adhezji i inwazji. Wyjaśniono mechanizmy regulacji hormonalnej i parakrynnej tych zjawisk. Zwrócono uwagę na wzajemne oddziaływanie zarodka i endometrium. Stopień skomplikowania i złożoność mechanizmów kontrolujących implantację powodują, że nawet niewielkie zaburzenia homeostazy organizmu prowadzą do ograniczenia płodności. Zaburzenia apozycji wiążą się z możliwością wystąpienia ciąży pozamacicznej lub łożyska przodującego, zaburzenia adhezji z brakiem implantacji, a więc z wczesnymi, często nieuchwytnymi poronieniami. Natomiast nieprawidłowości inwazji endometrium mogą być odpowiedzialne za przypadki łożysk przylegających i wrośniętych, ale także, na skutek indukcji zmian naczyniowych, mogą predysponować do nadciśnienia i jego powikłań.

Słowa kluczowe: zarodek, implantacja.

Summary: The paper presents comprehensively process of implantation with its stages of apposition, adhesion and invasion. Both endocrine and paracrine regulatory networks are also presented. The described phenomena are complicated and strictly controlled, thus any disorders in reproductive homeostasis in woman are connected with restriction in fertility. Pathology of apposition may lead to ectopic pregnancy or placenta praevia, early abortions are linked to disorders of adhesion, and finally pathology of invasion may cause improper placentation like placenta acreta or may predispose to pregnancy induced hypertension with its complications.

Key words: embryo, implantation.

Implantacja jest kluczowym procesem w rozwoju ciąży. Przez pierwsze 5–6 dni od zapłodnienia zarodek mający pewne rezerwy energetyczne i budulcowe ulega podziałom i przemieszczaniu z bańki jajowodu do jamy macicy. Skomplikowana gra hormonalna między zarodkiem a komórkami wydzielniczymi błony śluzowej dróg rodnych umożliwia prawidłowy wzrost blastocyście pozwalając jej osiągnąć prawidłowy potencjał rozwojowy. Zarówno przedimplantacyjny rozwój zarodka, jak i jego transport w jajowodzie i macicy podlega skomplikowanej regulacji [36, 37]. Na tym etapie

http://rcin.org.pl

rozwojowym zarodek ma pewne zapasy energetyczne i budulcowe, lecz w miarę zwiększania liczby komórek rozwój jego jest coraz bardziej zależny od pobierania substancji odżywczych z zewnątrz. Źródłem tych substancji są: płyn jajowodowy i płyn maciczny, które istotnie różnią się składem. Ten pierwszy zawiera mniejsze ilości glukozy i fosforanów, więcej zaś mleczanu i pirogronianu sodowego w porównaniu z płynem macicznym. W sumie ich skład determinuje prawidłowy rozwój zarodka, który w miarę wzrostu coraz aktywniej pobiera substancje ze środowiska. Poza składnikami odżywczymi i budulcowymi przy określonym składzie jonowym i pH, płyn jajowodowy i maciczny zawiera liczne czynniki biologicznie czynne. Substancje te wydzielane przez komórki błony śluzowej jajowodu i macicy działają chemotaktycznie i stymulująco na rozwijający się zarodek [7, 16].

Błona śluzowa jajowodu uwalnia czynniki należące do rodziny naskórkowych czynników wzrostu: EGF (*epidermal growth factor*), transformujący czynnik α – TGFα (*transforming growth factor alpha*), HB-EGF (*heparin binding EGF-like growth factor*), do rodziny insulinopodobnych czynników wzrostu – IGF (*insulin-like growth factor*), do interleukin – IL-1, IL-6 i IL-8 oraz do innych, takich jak: czynnik wzrostowy komórek macierzystych – SCF (*stem cell factor*), czynnik martwicy nowotworu – TNFα (*tumor necrosis factor alpha*) i czynnik hamujący białaczkę – LIF (*leukemia inhibitory factor*), które spełniają konkretne funkcje w narządzie rodnym kobiety [16, 19, 24, 29, 31, 36, 41]. Ważną rolę przypisuje się naskórkowym i insulinopodobnym czynnikom wzrostu. Naskórkowe czynniki wzrostu (EGF, HB-EGF, TGFα i amfiregulina) są silnymi mitogenami działającymi poprzez wspólny receptor EGF. TGFα i EGF stymulują rozwój przedimplantacyjny zarodków *in vitro*, pobudzając ich metabolizm i wzrost, czego wyrazem jest zwiększone wychwytywanie substancji odżywczych, co w rezultacie powoduje zwiększony odsetek zarodków dorastających do blastocysty [22, 27, 34]. Podobnie, białkami o bardzo silnym działaniu mitogennym są IGF-I, IGF-II i insulina [33]. Czynniki te nasilają proliferację komórek zarodka oraz przyczyniają się do wzrostu ilości komórek węzła zarodkowego i trofoektodermy. Są czynnikami współodpowiedzialnymi za proces kompakcji komórek, prowadzący do powstania moruli, a w późniejszych etapach rozwoju za formowanie się jamy blastocysty [18]. Insulinopodobne czynniki wzrostu regulują także metabolizm blastocysty. Aktywują układy transportowe odpowiedzialne za wychwytywanie glukozy ze środowiska zewnętrznego, nasilają zjawisko endocytozy i prawdopodobnie przyspieszają metabolizm białek, co przejawia się nasileniem replikacji, transkrypcji i translacji, a także degradacją białek. Oddziaływanie czynników grupy IGF ma charakter endo-, para- i autokrynny. Działanie endokrynne wynika z faktu, że czynniki typu IGF są produkowane przez większość tkanek organizmu, a następnie są transportowane drogą krwi lub płynu pozakomórkowego. Oddziaływanie parakrynne jest konsekwencją produkcji i uwalniania tych czynników przez komórki dróg rodnych kobiety, a autokrynne – następstwem zdolności do syntezy przez same komórki zarodka. Czynniki chemotaktyczne uwalniane przede wszystkim przez nabłonek błony śluzowej macicy, takie jak: IL-8 (interleukina-8), MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) oraz RANTES (*regulated on activated normal T cells expressed and secreted*)

http://rcin.org.pl

warunkują przemieszczanie zarodka do macicy i zajęcie odpowiedniej pozycji bezpośrednio przed implantacją [8, 13].

Przedimplantacyjny rozwój zarodka kończy się z chwilą opuszczenia przez blastocystę osłonki przezroczystej, co ma miejsce 6 dnia od zapłodnienia. Aby przebieg implantacji był prawidłowy, zarodek powinien osiągnąć jamę macicy w tym stadium rozwoju. Implantacja jest chyba najbardziej złożonym procesem prowadzącym do faktycznego rozpoczęcia ciąży. Rzutuje również na jej dalszy przebieg kliniczny, a tym samym potencjalne jej powikłania. Jest zjawiskiem aktywnym, w którym uczestniczy zarówno blastocysta, jak i błona śluzowa macicy [17, 36].

Wszelkie zachwiania równowagi wewnętrznej organizmu powodują zmiany ilościowe oraz jakościowe płynu jajowodowego i macicznego, co niekorzystnie odbija się na rozwoju zarodka. Przykładem tych subtelnych oddziaływań jest TNFα [41]. W warunkach fizjologicznych uwalniany jest w niewielkich ilościach, a jego oddziaływanie ogranicza się do indukcji apoptozy w zarodkach o nieprawidłowej strukturze bądź czynności. Jednak pewne stany patologiczne jak endometrioza czy hydrosalpinx powodują wzrost wydzielania TNFα. W obecności wysokich stężeń tej cytokiny nawet prawidłowy zarodek nie jest w stanie obronić się przed jej niekorzystnym oddziaływaniem, co powoduje zahamowanie w tworzeniu się jamy blastocysty, czego wynikiem jest powstanie niepełnowartościowego zarodka niezdolnego do dalszego rozwoju. Wykładnikiem tego jest zwiększony odsetek wczesnych poronień w tych wymienionych stanach.

W celu lepszego zrozumienia problemu przebieg implantacji można podzielić na następujące etapy: apozycji, adhezji, przylegania do błony śluzowej macicy i wreszcie inwazji, właściwego zagnieżdżenia w endometrium. Wszystkie procesy podlegają dokładnej regulacji, której warunkiem, niezależnie od etapu, jest swoista współpraca między zarodkiem a błoną śluzową.

Komórki trofoektodermy blastocysty produkują gonadotropinę kosmówkową (hCG), która w tej fazie cyklu oprócz hormonu luteinizującego, stymuluje ciałko żółte do produkcji progesteronu. Jak wiadomo, do implantacji dochodzi w połowie fazy lutealnej cyklu miesiączkowego, tzn. 6–7 dni po owulacji. Wtedy występują najwyższe stężenia progesteronu wynikające ze szczytowej funkcji ciałka żółtego. Progesteron warunkuje przygotowanie strukturalne i funkcjonalne endometrium. Jest czynnikiem sprawczym ekspresji swoistych integryn (patrz dalej) na powierzchni komórek nabłonkowych błony śluzowej, które uważa się za markery tzw. receptywności endometrium [14]. Okres największej receptywności przypada na 20–24 dzień cyklu miesiączkowego i tworzy tak zwane okienko implantacyjne, ponieważ tylko w tym czasie na powierzchni komórek endometrium występują wszystkie niezbędne do implantacji integryny. Integryny składają się z podjednostek: α i β, które tworzą heterodimery, a izoformy α1 α4 i β3 nadają tym heterodimerom różne funkcje [1, 9, 10, 20, 38]. Ma to istotne znaczenie, ponieważ podjednostka α1 występuje w całej fazie lutealnej (15–28 dzień cyklu), α4 stwierdza się między 14 a 24 dniem cyklu, a β3 pojawia się tylko na kilka dni licząc od 20 dnia cyklu. Ekspresja podjednostki β3 jest zależna od estrogenów, progesteronu oraz cytokin, np. IL-1 i czynników wzrostu, takich jak EGF czy TGF. W tym czasie

http://rcin.org.pl

zmienia się również struktura powierzchni komórek nabłonka endometrium. W trakcie transformacji błony komórkowej, licznie występujące mikrokosmki przekształcają się w nieregularne, spłaszczone i niskie wypustki oraz nieco dłuższe, buławkowato zakończone uwypuklenia zwane niekiedy pinopodami [4, 25, 35]. Przekształcenie powierzchni apikalnej komórek nie jest trwałe i utrzymuje się 24–48 godzin i jak się przyjmuje jest kolejnym objawem receptywności endometrium.

W fazie apozycji zajęcie przez blastocystę właściwego miejsca przed implantacją zależy w dużej mierze od czynności układu immunologicznego i chemotaktycznego działania takich czynników, jak: IL-8, MCP-1, oraz RANTES [8, 40]. Uważa się, że czynniki te mogą być uwalniane przez komórki pochodzenia mezenchymatycznego, komórki podścieliska błony śluzowej macicy oraz komórki układu immunologicznego. Czynniki te, przy założeniu prawidłowości strukturalnej i czynnościowej zarodka, powodują, że blastocysta najczęściej zagnieżdża się w okolicy dna macicy.

W fazie przylegania (faza adhezji) do powierzchni komórek endometrium kluczową rolę odgrywają interleukiny-1α i β (IL-1α, IL-1β), które produkowane przez zarodek, doprowadzają do ekspresji wspomnianej wcześniej podjednostki β3 z kompleksu integryn niezbędnych przy implantacji [6, 28, 30]. Nie mniej istotną rolę przypisuje się czynnikowi hamującemu białaczkę – LIF oraz czynnikom z grupy EGF [19, 32].

Faza inwazji, która kończy implantację, polega na zagłębieniu blastocysty w błonie śluzowej macicy po uprzednim zniszczeniu barier pod postacią komórek nabłonka, błony podstawnej oraz części podścieliska [3, 5, 26]. Inwazję umożliwiają enzymy proteolityczne, takie jak: kolagenazy, żelatynazy i proteazy należące do grupy metaloproteinaz (MMP), uwalniane przez trofoblast i doczesną. W aktywacji enzymów proteolitycznych uczestniczą limfokiny i cytokiny, w tym IL-1α, IL-1β, IL-6 i EGF oraz integryny. IL-1 stymulują komórki układu odpornościowego doczesnej do produkcji IFNγ (*interferon gamma*), który zapoczątkowuje kaskadę prowadzącą do aktywacji enzymów proteolitycznych kończących implantację. Natomiast IL-6 jest regulatorem aktywności metaloproteinaz doczesnowych i żelatynaz pochodzących z trofoblastu [32]. Kaskada enzymatyczna jest również uruchamiana przez tkankowy aktywator plazminogenu i plazminę. Pod koniec implantacji, bardzo istotna jest rola IL-1β, która indukuje w komórkach nabłonka endometrium produkcję czynnika wzrostowego komórek śródbłonka naczyń (VEGF – *vascular endothelial growth factor*). VEGF wpływa z kolei na rozwój naczyń doczesnej, zapoczątkowując tym samym proces tworzenia łożyska [12].

Istotną rolę w implantacji odgrywa układ immunologiczny, jednak szersze opisanie tego zagadnienia przekracza ramy niniejszej pracy. W immunologii implantacji kwestią zasadniczą jest przyzwolenie na zagnieżdżenie obcego antygenowo zarodka. Zarodek dzięki ekspresji antygenów zgodności tkankowej klas HLA-C, HLA-E i przede wszystkim HLA-G jest chroniony przed atakiem matczynych komórek układu odpornościowego, np. komórek NK (CD56+) [15, 21].

Również z tego powodu, jak i omówionych wcześniej zjawisko implantacji porównywane jest do „kontrolowanej samoograniczającej się reakcji zapalnej", gdyż uczestniczą w niej zarówno czynniki prozapalne, jak i komórki układu odpornościowego.

http://rcin.org.pl

Wobec tego zachwianie tej subtelnej równowagi może prowadzić do różnorodnych patologii rozrodu. Nadmierna ekspresja czynników zapalnych istniejąca w niektórych stanach patologicznych, takich jak endometrioza czy wodniak jajowodu, może prowadzić do uszkodzenia zarodka [23]. Zarodek będąc antygenowo obcy uległby rozpoznaniu i zniszczeniu, gdyby nie czynniki działające immunosupresyjnie i maskująco wobec niego. Istotną rolę przywiązuje się glykodelinie tzw. białku łożyskowemu 14 (PP-14), który powoduje supresję komórek NK [39]. Uważa się również, że złożona struktura tzw. MUC-1 episialiny (*polimorphic epithelial mucin-1*), występującej w dużej ilości w okresie okołoimplantacyjnym na powierzchni błony komórkowej endometrium chroni zarodek przed jego rozpoznaniem przez komórki odpowiedzi immunologicznej [2, 11].

Zaburzenia apozycji wiążą się z nieprawidłowym miejscem implantacji, zaburzenia adhezji z brakiem implantacji, a więc z wczesnymi, często nieuchwytnymi poronieniami. Natomiast błędy powstałe podczas inwazji endometrium mogą być odpowiedzialne za przypadki łożysk przylegających i wrośniętych, ale także, na skutek indukcji zmian naczyniowych, mogą predysponować w II i III trymestrze ciąży do nadciśnienia i jego powikłań (PIH – *pregnancy induced hypertension*) [42].

PIŚMIENNICTWO

[1] ACOSTA AA, ELBERGER, L, BORGHI, M. *et al.* Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril* 2000; **73**: 788–798.

[2] APLIN JD. MUC-1 glycosylation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. *Hum Reprod* 1999; **14**: Suppl 2: 17–25.

[3] APLIN JD, HAIGHT, LACEY H *et al.* Tissue interactions in the control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; **55**: 57–64.

[4] BENTIN-LEY U, SJÖGREN S, NILSSON, HAMBERGER L, LARSSEN JF, HORN T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation *in vitro*. *Hum Reprod* 1999; **14**: 515–520.

[5] BISCHOF P, MEISSER A, CAMPANA A. Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil* 2000, **55** Suppl.: 65–71.

[6] BLOOR DJ, METCALFE AD, RUTHERFORD A. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod* 2002; **8**: 237–245.

[7] BOATMAN DE. Responses of gametes to the oviductal environment. *Hum Reprod* 1997; **12**: 133–149.

[8] CABALLERO-CAMPO P, DOMÍNGUEZ F, COLOMA JULIO, MESEGUER MARCOS, REMOHÍ J, PELLICER ANTONIO, SIMÓN C. Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation. *Mol Hum Reprod* 2002; **8**: 375–384.

[9] COUTIFARIS C, OMIGBODUN A, COUKOS G. Integrins, endometrial maturation, and human embryo implantation. *Sem Reprod Endocrinol* 1998; **16**: 219–229.

[10] CREUS M, ORDI J, FÁBREGUES F, CASAMITJANA R, FERRER B, COLL E, VANRELL JA, BALASCH J. αvβ3 integrin expression and pinopod formation in normal and out-of-phase endometria of fertile and infertile women. *Hum Reprod* 2001; **17**: 2279–2286.

[11] DELOIA JA, KRASNOW JS, BREKOSKY J *et al.* Regional specialization of the cell membrane-associated, polymorphic mucin (MUC1) in human uterine epithelia. *Hum Reprod* 1998; **13**: 2902–2909.

http://rcin.org.pl

[12] FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* **18** (1): 4–25.
[13] GARCIA-VELASCO JA, ARICI A. Chemokines and human reproduction. *Fertil Steril* 1999; **71**: 983–993.
[14] GIUDICE L C. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999; **14**, *Suppl 2*: 3–16.
[15] JONSON PM, CHRISTMAS SE, VINCE GS. Immunological aspects of implantation and implantation failure. *Hum Reprod* 1999; **14**, Suppl 2: 26–36.
[16]KAYE PL. Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod* 1997; **2**: 121–127.
[17] KLENTZERIS LD. The role of endometrium in implantation. *Hum Reprod* 1997; **12:** 170–175
[18] KOWALIK A, LIU H-C, HE Z-Y, MELE C, BARMAT L, ROSENWAKS Z. Expression of the insulin-like growth factor-1 gene and its receptor in preimplantation mouse embryos; is it a marker of embryo viability? *Mol Hum Reprod* 1999; **5**: 861–865.
[19] LASS A, WEISER W, MUNAFO A, LOUMAYE E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 2001; **76**: 1091–1096.
[20] LESSEY BA. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1998; **13** Suppl. 3: 247–258.
[21] LOKE YW, KING A. Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; **14**(5): 827–837
[22] MARTIN KL, BARLOW DH, SARGENT JL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 1998; **13**: 1645–1652.
[23] MEYER WR, CASTELBAUM A, SOMKUTI S, SAGOSKIN AW, DOYLE, HARRIS JE *et al.* Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997; **12**: 1393–1398.
[24] MITSUNARI M, HARADA T, TANIKAWA M *et al.* The potential role of stem cell factor and its receptor c-kit in the mouse blastocyst implantation. *Mol Hum Reprod* 1999; **5**: 874–879.
[25] MURPHY CR. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity Pinopods- or uterodomes? *Hum Reprod* 2000; **15**: 2451–2454.
[26] NAKAYAMA T, FUJIWARA H, MAEDA M, INOUE T, YOSHIOKA S, MORI T, FUJII S. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion *in vitro:* HCG enhances the effects of PBMC. *Hum Reprod* 2001; **17:** 207–212
[27] ÖSTERLUND C, FRIED G. TGFβ receptor types I and II and the substrate proteins Smad 2 and 3 are present in human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2000; **6**: 498–503.
[28] RUFAS O, FISCH B, ZIV S, SHALGI R. Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. *Mol Hum Reprod* 2000; **6**: 163–169.
[29] SIMON C, MARTIN JC, PELLICER A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; **14**: 815–826.
[30] SIMÓN C, VALBUENA D, KRÜSSEL J *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil Steril* 1998; **70**: 896–906.
[31] SIMON C, MORENO C, REMOHI J *et al.* Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol* 1998; **39**: 117–131.
[32] SMITH SK, CHARNOCK-JONES DS, SHARKEY AM. The role of leucemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction. *Hum Reprod* 1998; **13**: Suppl 3: 237–243.
[33] SOONG YS, WANG HS, CHENG SY, CHIEN HJ. Expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA in embryos and endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 153–157.
[34] STAVREUS-EVERS A, AGHAJANOVA L, BRISMAR H *et al.* Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Mol Hum Reprod* 2002; **8:** 765–769.
[35] STAVREUS-EVERS A, NIKAS G, SAHLIN L, ERIKSSON H, LANDGREN BM. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 2001; **76**:782–791
[36] SUNDER S, LENTON EA. Endocrinology of the peri-implantation period. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; **14**: 789–800.
[37] VELASQUEZ L.A, MAISEY K, FERNANDEZ R *et al.* PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human Fallopian tube: possible role of embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus. *Hum Reprod* 2001; **16:** 1583–1587.

http://rcin.org.pl

[38] VON WOLFF M, STROWITZKI T, BECKER V, ZEPF C, TABIBZADEH S, THALER CJ. Edometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around he time of the „implantation window". *Fertil Steril* 2001; **76**: 775–781.

[39] WESTERGAARD LG, WIBERG N, ANDERSEN CY, LAURSEN SB, KLIEM A, WESTERGAARD JG *et al.* Circulating concentrations of placenta protein 14 during the natural menstrual cycle in women significantly reflect endometrial receptivity to implantation and pregnancy during successive assisted reproduction cycles. *Hum Reprod* 1998; **13**: 2612–2619.

[40] WOOD GW, HAUSMANN E, CHOUDHURI R. Relative role of CSF-1, MCP-1/JE and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol Reprod Dev* 1997; **46**: 62–70.

[41] WUU YD, PAMPFER S, BECQUET P, VANDERHEYDEN I, LEE KH, DE HERTOGH R. Tumor necrosis factor alpha decreases the viability of mouse blastocysts *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* 1999; **60**: 479–483.

[42] ZHOU Y, DAMSKY CH, CHIU K. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993; **91**: 950–960.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano:04.12.2002 r.
Przyjęto: 10.01. 2003 r.
Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30 2003 NR 2 (383–397)

FUNKCJA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH JONY CA^{2+} Z RODZINY S100*

FUNCTION OF CALCIUM BINDING PROTEINS OF THE S100 FAMILY

Beata JASTRZĘBSKA i Anna FILIPEK

Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej,
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa

Streszczenie: Jony wapniowe oraz białka wiążące wapń pełnią funkcję w wielu procesach komórkowych. Wśród białek wiążących jony Ca^{2+}, mających motywy *EF-hand*, wyróżnia się grupę polipeptydów z rodziny białek S100. Większość białek z tej rodziny liczącej obecnie 20 przedstawicieli została odkryta w ostatnim dziesięcioleciu. Są to białka o podobnej strukturze pierwszorzędowej, gdyż wykazują 30–60% identyczności w sekwencji aminokwasowej. Poszczególne białka S100 występują w określonych komórkach i tkankach, a ich funkcja nie jest w pełni wyjaśniona. Jednakże sugerowany udział białek S100 w wielu procesach, takich jak: fosforylacja, regulacja aktywności enzymów, adhezja, przeżywalność i regeneracja neuronów oraz apoptoza komórek nerwowych, wskazuje, że białka te mogą odgrywać ważną rolę w komórce oraz w komunikacji międzykomórkowej.

Słowa kluczowe: białka wiążące jony Ca^{2+}, białka S100, białka efektorowe, przekazywanie sygnału w komórce, komunikacje międzykomórkowe.

Summary: Calcium ions and calcium binding proteins are involved in many cellular processes. Among the calcium binding proteins containing "EF-hand" motifs one can distinguish a group of proteins called S100 family. The majority of S100 proteins were discovered during the last ten years and, at present, this family contains 20 proteins. S100 proteins have similar primary structure since they possess 30–60% identity in amino acid sequences. Individual S100 proteins exhibit cell and tissue specific expression and their function has not been fully explained. However, the involvement of S100 proteins in many processes such as phosphorylation, enzyme activity, adhesion, survival and regeneration of neurons or apoptosis of neuronal cells, indicates, that S100 proteins might play an important intracellular and extracellular role.

Kay words: calcium binding proteins, S100 proteins, target proteins, cellular signaling, intercellular communication..

*Praca finansowana przez KBN w ramach grantu 3 P04A 043 22.

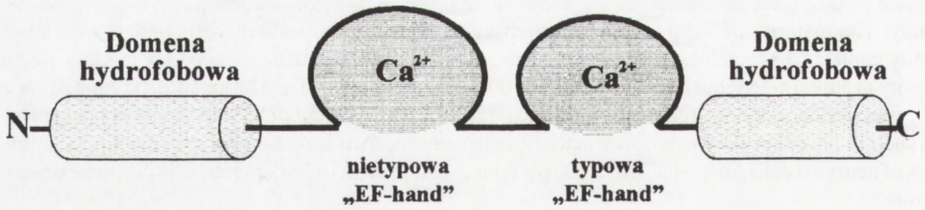
http://rcin.org.pl

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK S100

Białka S100 wiążą dwa jony Ca^{2+} za pomocą wyspecjalizowanych struktur zwanych motywami *EF-hand* [36]. Motyw *EF-hand* składa się z dwóch α-helis i pętli wiążącej jon Ca^{2+}. Pętla w pierwszym motywie *EF-hand*, znajdującym się w aminowej części cząsteczki białek S100 zawiera 14 reszt aminokwasowych i jest specyficzna tylko dla białek S100. Druga pętla znajdująca się w karboksylowej części cząsteczki zawiera 12 reszt aminokwasowych i jest typowa dla ponad 200 białek wiążących jony Ca^{2+} (ryc. 1). Powinowactwo białek S100 do Ca^{2+} jest niższe niż w przypadku powszechnie znanej kalmoduliny, troponiny C czy parwalbuminy. Związanie jonów Ca^{2+} prowadzi do zmiany konformacji cząsteczki białka S100, wpływając między innymi na jego oddziaływanie z białkiem efektorowym. Niektóre z białek S100 mogą również wiązać jony Zn^{2+} oraz jony Cu^{2+} [27], a miejsca wiązania tych kationów są inne niż miejsca wiązania jonów Ca^{2+}. Wykazano, że oddziaływanie z białkiem efektorowym lub związanie jonów Zn^{2+} zwiększa powinowactwo cząsteczki białka S100 do jonów Ca^{2+} [3].

Białka S100 mają niską masę cząsteczkową (9–14 kDa). Wyjątek stanowią profilagryna, trychohialina i repetyna, które mają wyższą masę cząsteczkową [40, 41, 54]. U człowieka geny kodujące 13 białek S100 (spośród znanych 20) znajdują się na chromosomie 1 [57]. Geny pozostałych białek S100 są na innych chromosomach, np. gen S100P na chromosomie 4, gen S100B na chromosomie 21, a gen kalbindyny D9k na chromosomie X.

W komórce, białka S100 występują w postaci dimerów niekowalencyjnych. Jedynym znanym białkiem, które nie tworzy takiego dimeru, jest kalbindyna D9k. Niektóre białka S100 mające reszty cysteinowe mogą tworzyć dimery kowalencyjne poprzez mostki dwusiarczkowe S-S. Inne białka S100 tworzą heterodimery, np. S100B tworzy heterodimer z S100A11, S100A1 z S100B, S100B z S100A6, S100A1 z S100A4, S100A8 z S100A9 [9, 55, 73, 78]. Sugeruje się, że dimeryzacja białek S100 ma znaczenie dla ich aktywności biologicznej.



RYCINA 1. Schemat monomeru białka S100

http://rcin.org.pl

EKSPRESJA BIAŁEK S100 W KOMÓRKACH PRAWIDŁOWYCH I ZMIENIONYCH CHOROBOWO

Charakterystyczną cechą białek S100 jest ich występowanie w określonych typach komórek i tkanek. Na przykład S100B występuje głównie w komórkach glejowych, S100A6 (kalcyklina) w komórkach nabłonkowych i fibroblastach, S100A1 w neuronach, w mięśniu szkieletowym i sercowym oraz w nerce, a S100A8, S100A9 i S100A12 w granulocytach i monocytach. W niektórych typach komórek może występować kilka różnych białek S100. Wykazano, że poziom i miejsce ekspresji białek S100 może zmieniać się w czasie rozwoju oraz w stanach chorobowych. Również, pewne czynniki, takie jak kwas retynowy lub czynniki wzrostowe, mogą modulować poziom ekspresji tych białek [42, 68]..

W komórkach zmienionych chorobowo obserwuje się podwyższoną ekspresję większości białek S100 [34]. W przypadku białka S100A4 i S100A6 wykazano, że istnieje korelacja pomiędzy poziomem ekspresji mRNA tych białek w komórkach nowotworowych a zdolnością komórek do tworzenia przerzutów. Na przykład nadekspresja S100A4 u myszy indukuje przerzuty nowotworu sutka, a podanie antysensownego mRNA dla S100A4 hamuje ruchliwość i inwazyjność komórek nowotworowych [8, 71, 72].

W przypadku S100A6 (kalcykliny) podwyższony poziom tego białka zaobserwowano w nowotworach, takich jak: przewlekła białaczka szpikowa, czerniak, nerwiak zarodkowy [5, 69, 74]. W komórkach czerniaka jest też zwiększona ekspresja białka S100B, a zahamowanie ekspresji S100B zmniejsza proliferację komórek [60].

W keratynocytach, w stanach łuszczycowych, zwiększonej ekspresji ulega białko S100A7 [23]. Wykazano, że S100A7 w tych komórkach oddziałuje z białkiem wiążącym kwasy tłuszczowe zwanym E-FABP (z ang. *epidermal-type fatty acid-binding protein*). Sugeruje się też, że oddziaływanie S100A7 z E-FABP może odgrywać ważną rolę w procesie różnicowania keratynocytów.

WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK S100 A ICH FUNKCJA

Białka S100 pełnią wiele różnych funkcji w komórce [10, 11]. Mogą one wpływać między innymi na aktywność enzymów, fosforylację białek, transkrypcję genów, reorganizację cytoszkieletu, regulację homeostazy wapniowej. Ponadto, białka S100 są wydzielane na zewnątrz komórki i mogą uczestniczyć w procesach związanych z komunikacją międzykomórkową. Co sprawia, że białka S100 pomimo wysokiej identyczności w sekwencji aminokwasowej pełnią tak wiele różnorodnych funkcji? Sugeruje się, że przyczyną może być szereg modyfikacji potranslacyjnych, którym ulegają te białka. I tak np. fosforylacja S100A8 i S100A9 jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za translokację tych białek do błony komórkowej w czasie aktywacji

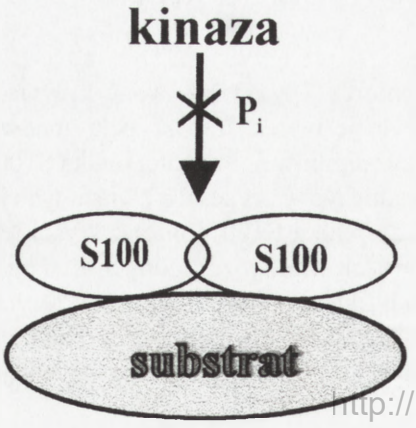
http://rcin.org.pl

neutrofilów, natomiast wiązanie nienasyconych kwasów tłuszczowych może być odpowiedzialne za wydzielanie białek S100A8 i S100A9 poza komórkę. Inną modyfikacją może być tworzenie dimerów. Wykazano, że tylko dimer S100B utworzony przez mostki siarczkowe jest substratem kinazy kazeinowej II, a ufosforylowane w ten sposób S100B jest czynnikiem wykazującym właściwości mitogenne. Inne białka S100 są substratami transglutaminaz i tworzą multimery. Białka S100 ulegają też acetylacji i formylacji. Niektóre reszty cysteinowe w białkach S100 ulegają utlenieniu, co może mieć wpływ na wiązanie S100 z białkami efektorowymi. Wiadomo też, że oddziaływanie z białkiem efektorowym może zachodzić zależnie lub niezależnie od związania jonów Ca^{2+} przez białko S100. A zatem sugeruje się, że wszystkie wyżej wymienione modyfikacje i cechy białek S100 wpływają na różnorodność funcjonalną tej grupy białek. Należy jednak zauważyć, że są białka S100, które wykazują podobne działanie, np. S100A1 i S100B wiążą się z tubuliną czy GFAP (z ang. *glial fibrillary acidic protein*) lub też aktywują ten sam enzym, np. cyklazę guanylanową.

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA FUNKCJA BIAŁEK S100

Regulacja fosforylacji białek

Białka S100 hamują fosforylację poprzez oddziaływanie z substratem kinazy (ryc. 2). W efekcie tego oddziaływania zmienia się konformacja substratu w ten sposób, że jego miejsca fosforylacji są niedostępne dla specyficznej kinazy. Wśród białek, których fosforylacja jest hamowana przez wiązanie białek S100, są substraty kinazy białkowej C, takie jak: MARCKS, neurogranina, neuromodulina [61], czynnik transkrypcyjny MyoD [1], białko p53 [2, 58], białko GFAP i wimentyna [81]. Hamowanie fosforylacji tych substratów zachodzi głównie w wyniku wiązania się z białkiem S100A1 i/lub S100B. Również hamowanie fosforylacji aneksyn I i II jest spowodowane ich



RYCINA2.Hamowanie fosforylacji substratów kinaz przez białka S100

http://rcin.org.pl

wiązaniem się odpowiednio z S100A11 i S100A10 [59]. Hamowanie fosforylacji łańcucha ciężkiego miozyny przez kinazę białkową C jest wynikiem oddziaływania z białkiem S100A4 [39]. Zdolność białek S100 do obniżania stopnia fosforylacji substratów kinaz sugeruje, że białka S100 mogą pełnić funkcję w przekazywaniu sygnałów i regulować specyficzne procesy zachodzące w komórce.

Regulacja aktywności enzymów

W tabeli 1 przedstawiono enzymy, których aktywność może być modulowana przez białka S100. S100A1 i w mniejszym stopniu S100B stymulują aktywność twiczyny w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+} i Zn^{2+} [25]. Twiczyna należy do rodziny kinaz białkowych, włączonych w regulację skurczu mięśni u bezkręgowców. U kręgowców białkiem wykazującym wysokie podobieństwo do twiczyny jest tytyna. Zaobserwowano, że białko S100A1 w warunkach podwyższonego stężenia jonów Ca^{2+} w komórce ulega translokacji do centralnej części sarkomeru, gdzie znajduje się katalityczna domena twiczyny/tytyny. Dlatego też uważa się, że S100A1 może być fizjologicznym aktywatorem twiczyny/tytyny i odgrywać ważną rolę w procesie skurczu mięśni [25]. S100B i w mniejszym stopniu S100A1, w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+}, aktywują serynowo-treoninową kinazę Ndr [48]. Sugeruje się, że oddziaływanie pomiędzy S100B i kinazą Ndr może mieć znaczenie fizjologiczne, ponieważ w niektórych komórkach zaobserwowano podwyższoną ekspresję obu białek.

Wykazano, że białka S100B i S100A1 występują w komórkach fotoreceptorowych siatkówki u kręgowców, gdzie pod wpływem wzrastającego stężenia jonów Ca^{2+} stymulują aktywność cyklazy guanylanowej związanej z błonami [12, 43, 53]. Stężenie jonów Ca^{2+}, przy którym białka S100 aktywują cyklazę guanylanową, jest dużo wyższe niż stężenie Ca^{2+}, przy którym inne białka zwane GCAPs (ang. *guanyl cyclase activating proteins*) aktywują ten enzym [53]. A zatem sugeruje się, że białka S100A1 i S100B regulując aktywność cyklazy guanylanowej odgrywają ważną rolę w procesie widzenia.

Białko S100A6 (kalcyklina) oraz inne białka S100 wiążą się, w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+}, z białkiem o masie cząsteczkowej 30 kDa, zwanym CacyBP/SIP [13, 14]. CacyBP/SIP jest składnikiem nowo odkrytego kompleksu ubikwitynującego β-kateninę [46]. Pozostaje jednak do wyjaśnienia, w jaki sposób

TABELA 1. Regulacja aktywności niektórych enzymów

Białko S100	Enzym	Efekt	Piśmiennictwo
S100A1	Kinaza twiczyny	Stymulacja	[25]
S100B	Kinaza Ndr	Stymulacja	[48]
	Cyklaza guanylanowa	Stymulacja	[12, 44, 53]
S100A8/S100A9	Kinaza kazeinowa I i II	Hamowanie	[49]
S100A10	Fosfolipaza A2	Hamowanie	[76]

http://rcin.org.pl

oddziaływanie CacyBP/SIP z kalcykliną i innymi białkami S100 wpływa na aktywność kompleksu ubikwitynującego.

Heterodimer S100A8/S100A9 reguluje aktywność kinaz kazeinowych I i II, a także aktywność RNA-polimeraz I i II [49]. Ekspresja S100A8 i S100A9 oraz regulacja przez te białka kinazy kazeinowej I i II zachodzi tylko w makrofagach w odpowiednim stadium funkcjonalnym i wydaje się, że może być związana z odpowiedzią na stany zapalne.

S100A10 hamuje aktywność fosfolipazy PLA_2 i powoduje zmniejszenie wydzielania kwasu arachidonowego [76]. S100A10 wiąże się z fosfolipazą w jej końcu karboksylowym, a efekt hamowania nie zależy od związania jej naturalnego ligandu – aneksyny II. Zahamowanie ekspresji S100A10 przez zastosowanie antysensownych oligonukleotydów powoduje wzrost aktywności PLA_2 i równolegle zwiększenie wydzielania kwasu arachidonowego przez komórki w hodowli. Uzyskane wyniki wskazują, że S100A10 może odgrywać rolę w hamowaniu procesów zapalnych.

Regulacja homeostazy jonów Ca^{2+}

W komórce pobudzonej wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{2+}. Lokalny wzrost stężenia tego kationu powoduje aktywację receptora rianodynowego i w efekcie dalsze uwalnianie jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej [70]. Jest to tzw. mechanizm stymulowanego wapniem uwalniania wapnia (ang. *calcium induced calcium release*). Wykazano, że w tym procesie, w komórkach mięśni szkieletowych stymulującą rolę odgrywa białko S100A1 [70]. Podobną aktywność zaobserwowano dla mieszaniny białek S100A1 (20%) i S100B (80%). Stwierdzono też, że białko S100A1 wiąże się bezpośrednio z receptorem rianodynowym, zwiększając jego powinowactwo względem rianodyny przy nanomolowych stężeniach jonów Ca^{2+}. W tych warunkach wzrasta prawdopodobieństwo otwarcia kanału rianodynowego i zwiększa się napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy.

W komórkach glejowych, wyizolowanych z móżdżku noworodka myszy pozbawionej genu białka S100B stężenie jonów Ca^{2+} po stymulacji KCl lub kofeiną jest wyższe niż w komórkach glejowych z myszy normalnych [77]. Wynik ten wskazuje na udział białka S100B w obniżaniu stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu. Chociaż S100B wykazuje niższe powinowactwo do jonów Ca^{2+} niż np. parwalbumina (białko chelatujące jony Ca^{2+}), to jednak w kompleksie z białkiem efektorowym wzrasta powinowactwo białka S100B do jonów Ca^{2+}. Może ono wówczas, podobnie jak parwalbumina, wpływać na zmianę stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie.

Oddziaływanie białek S100 z cytoszkieletem

Białka S100 regulują wszystkie składniki cytoszkieletu: mikrotubule, filamenty pośrednie i mikrofilamenty wraz z tropomiozyną i miozynę. S100B wiąże się z mikrotubulami tworzącymi centriole, wrzeciono mitotyczne oraz z mikrotubulami cytoplazmatycznymi [11, 64]. Z tubuliną wiąże się ono w rejonie, który bierze udział w tworzeniu protofilamentów i wpływa na proces polimeryzacji mikrotubul. Wydaje się,

http://rcin.org.pl

że S100B może hamować tworzenie mikrotubul i uczestniczyć w ich przebudowie w warunkach wzrastającego wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+}. Sugeruje się, że podobną funkcję może pełnić również S100A1, gdyż zahamowanie syntezy S100A1 w komórkach PC12 powodowało wzrost poziomu mikrotubul [82].

Białka S100 mają też wpływ na filamenty pośrednie. I tak np. S100A1 i S100B stymulują rozpad filamentów pośrednich, takich jak: filamenty desminowe i filamenty utworzone z GFAP (z ang. *glial fibrillary acidic protein*). Wykazano, że S100A1 i S100B wiążą się z desminą i GFAP w końcu aminowym tych białek, który jest odpowiedzialny za tworzenie filamentów pośrednich [11, 62]. Zaobserwowano, że w astrocytach wyizolowanych z mózgu myszy, u których zahamowano ekspresję S100B, zwiększa się ilość filamentów utworzonych z GFAP, co wskazuje na udział S100B w rozpadzie filamentów pośrednich. A zatem białka S100A1 i S100B mogą odgrywać rolę w zachowaniu właściwej ilości i orientacji filamentów pośrednich w komórce. Przeciwny efekt na tworzenie filamentów pośrednich wykazuje białko S100A10, które w kompleksie z aneksyną II wiąże się z GFAP i stymuluje formowanie tych filamentów [17]. Białka S100A8, S100A9 i S100A12 ulegają translokacji z cytoplazmy do błony komórkowej i filamentów pośrednich utworzonych z wimentyny w monocytach i granulocytach, a także do filamentów keratynowych w komórkach nabłonkowych [20]. Podobnie, translokacji ulega S100A6 (kalcyklina) [64]. W przypadku białek S100A9 i S100A12 translokacja zachodzi na skutek wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie i jest regulowana przez fosforylację tych białek. Translokacja S100A8 do błony plazmatycznej i struktur cytoszkieletu jest też najczęściej poprzedzona utworzeniem heterodimeru S100A8/S100A9.

S100A1 wiąże się z synapsyną I i II, neuronalnymi białkami, które w zakończeniach nerwowych w mózgu przyłączają pęcherzyki synaptyczne do F-aktyny i są ważne w procesie transmisji sygnału nerwowego [6]. Chociaż znaczenie oddziaływania S100A1 z synapsyną nie jest znane, to jednak kolokalizacja obu białek w zróżnicowanych komórkach PC12 sugeruje, że takie oddziaływanie może zachodzić w warunkach *in vivo* [26].

S100A10 w kompleksie z aneksyną II wiąże się z F-aktyną wpływając na tworzenie filamentów aktynowych. Wydaje się, że kompleks S100A10-aneksyna II może brać udział w reorganizacji F-aktyny w procesie egzocytozy, a także uczestniczyć w zakotwiczaniu filamentów w błonie komórkowej [18, 56]. Z białkami wiążącymi aktynę, takimi jak kaldesmon czy kalponina, oddziałują białka S100A1 i S100B. Wiązanie białek S100 znosi hamujący wpływ kaldesmonu i kalponiny na aktywność zależnej od aktyny i Mg^{2+}ATP-azy miozynowej. W warunkach *in vitro* z tropomiozyną, kaldesmonem i kalponiną wiąże się też S100A6 (kalcyklina) [15, 21, 73]. Z tropomiozyną oddziałuje również białko S100A2, które w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+} ulega translokacji z cytoplazmy do jądra w różnicujących komórkach nabłonkowych hodowanych *in vitro* [19]. A zatem wydaje się, że S100A2 poprzez oddziaływanie z tropomiozyną wpływa na organizację filamentów aktynowych. Z filamentami aktynowymi wiążą się też S100A1 [40] i S100A11 [78]. Wykazano, że w komórkach mięśniowych S100A1 ulega translokacji do mikrofilamentów na skutek podwyższonego

http://rcin.org.pl

stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie [43]. Jednakże funkcjonalne znaczenie tworzenia kompleksu S100A1 z filamentami nie jest znane. Natomiast S100A11, wiążąc się z F-aktyną w warunkach *in vitro*, hamuje aktywność zależnej od aktyny i Mg^{2+}ATP-azy miozynowej. Brak jest jednak dowodów potwierdzających, że S100A11 może oddziaływać z F-aktyną w warunkach *in vivo*.

S100A4 wiąże się z łańcuchem ciężkim miozyny mięśniowej i niemięśniowej oraz z tropomiozyną mięśniową [56]. Oddziaływanie S100A4 z tropomiozyną może wpływać na regulację aktywności zależnej od aktyny i Mg^{2+}ATP-azy miozynowej. Oddziaływanie S100A4 z łańcuchem ciężkim miozyny hamuje jego fosforylację przez kinazę białkową C i powoduje depolimeryzację jej filamentów. Tak więc, S100A4 reguluje dynamikę filamentów miozynowych, w których tworzeniu ważną rolę odgrywa proces fosforylacji.

Wszystkie opisane powyżej obserwacje wskazują, że białka S100 mogą brać udział w regulacji morfologii komórek i dynamiki podstawowych składników cytoszkieletu przez bezpośrednie lub pośrednie oddziaływanie z mikrotubulami, filamentami pośrednimi i białkami mikrofilamentów. Dimeryczna struktura białek S100 stwarza potencjalne możliwości tworzenia połączeń pomiędzy poszczególnymi składnikami cytoszkieletu lub tworzenia połączeń między podjednostką cytoszkieletu i błoną plazmatyczną. Białka S100, dzięki swojej strukturze, mogą również zakotwiczać w cytoszkielecie niektóre swe białka efektorowe.

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA ROLA BIAŁEK S100

Wydzielanie białek S100

Wykazano, że niektóre białka S100 znajdują się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Na przykład S100A6 (kalcyklina) występuje w płynie owodniowym, S100B znajduje się w surowicy krwi oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym, a białka S100A8, S100A9 i S100A12 znajdują się w surowicy krwi i mazi stawowej zwłaszcza u pacjentów, u których występują różnego rodzaju stany zapalne. Wszystkie te białka, a także S100A4 i S100A7 występują w pożywce komórek hodowanych *in vitro*.

Wpływ białek S100 na wydzielanie cząsteczek sygnałowych

Wykazano, że S100A6 w warunkach *in vitro* wpływa na wydzielanie insuliny z komórek β-trzustki w hodowli [52]. Komórki, którym podano S100A6 w stężeniu końcowym 1 μM, wydzielały około 40% insuliny więcej niż komórki kontrolne. Podobnie wykazano, że S100A6 zwiększa o 50% wydzielanie laktogenu łożyskowego z komórek trofoblastu [67]. Ponieważ ekspresja S100A6 zachodzi w tkankach specyficznych dla okresu ciąży, białko to może mieć wpływ na regulację wydzielania laktogenu w warunkach *in vivo*. Ponadto wykazano, że S100A6 hamuje w warunkach *in vitro* wydzielanie histaminy z komórek tucznych [16]. Histamina jest wielofunkcyjną aminą

http://rcin.org.pl

występującą głównie w komórkach tucznych, ale także w neuronach, gdzie pełni rolę neuroprzekaźnika. A zatem S100A6 może mieć wpływ na wydzielanie różnych cząsteczek sygnałowych.

Wpływ białek S100 na adhezję

Adhezja komórek jest procesem, który może być regulowany przez białko S100A9 [50]. Adhezja leukocytów do śródbłonka naczyń krwionośnych jest jednym z etapów przechodzenia tych komórek przez ścianę naczyń i dalej w miejsce przeznaczenia w organizmie. Wykazano, że w warunkach *in vitro* S100A9 ma dodatni wpływ na adhezję neutrofili do fibrynogenu. Wydaje się też, że S100A9 wpływa na adhezję przez aktywację integryny Mac-1.

Białka S100 jako czynniki chemotaktyczne

Wśród białek S100 znajduje się kilka białek będących czynnikami chemotaktycznymi. Czynniki chemotaktyczne odgrywają ważną rolę w regulacji czynności układu immunologicznego, w szczególności w różnych stanach zapalnych. I tak wykazano, że S100A2 jest czynnikiem chemotaktycznym w stosunku do eozynofili [38], S100A7 – w stosunku do neutrofili i limfocytów $CD4^+$ [66], a białko CP-10 wykazuje właściwości chemotaktyczne w stosunku do leukocytów wielojądrowych i monocytów w warunkach *in vitro* i *in vivo* [79].

W niektórych stanach zapalnych, takich jak: mukowiscydoza, reumatoidalne zapalenie stawów, chroniczne zapalenie oskrzeli, wykryto obecność dimeru S100A8/S100A9 w mazi stawowej oraz w surowicy krwi. Monomer białka S100A8 w formie nieutlenionej wykazuje właściwości chemotaktyczne wobec leukocytów, które są mobilizowane do miejsc zapalnych i uczestniczą w hamowaniu procesów zapalnych. Kowalencyjny dimer S100A8 nie ma takich właściwości [37].

Zewnątrzkomórkowa rola białek S100 w układzie nerwowym

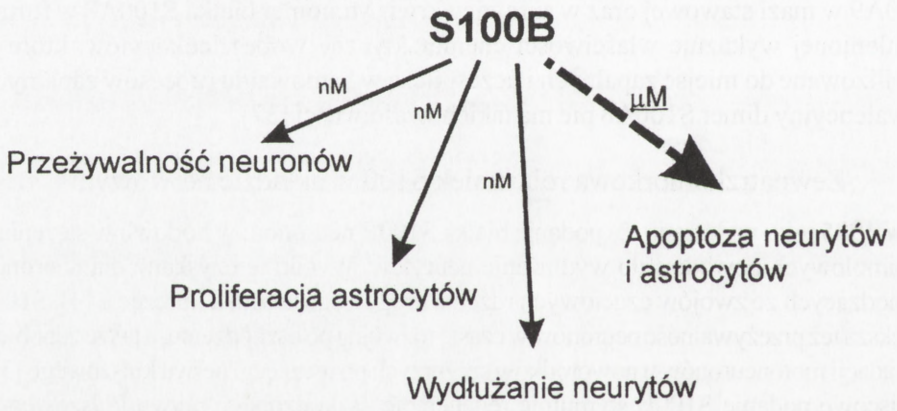
W 1985 roku wykazano, że podanie białka S100B neuronom w hodowli w stężeniach nanomolowych powodowało wydłużanie neurytów. Wyniki te uzyskano dla neuronów pochodzących ze zwojów czuciowych rdzenia kręgowego zarodka kurczęcia [4]. S100B zwiększa też przeżywalność neuronów w czasie rozwoju i po uszkodzeniu, a także zapobiega degradacji motoneuronów u noworodków szczurzych po usunięciu nerwu kulszowego [35]. Miejscowe podanie S100B stymuluje regenerację uszkodzonego nerwu kulszowego u szczurów, co wskazuje na fizjologiczną rolę S100B jako czynnika neurotroficznego [24]. S100B wpływa też dodatnio na proliferację astrocytów [7]. Proprzeżyciowa aktywność zewnątrzkomórkowego S100B i zdolność tego białka do stymulowania wzrostu neurytów zachodzi prawdopodobnie na skutek aktywacji receptora RAGE (z ang. *receptor for advanced glycation end products*) i translokacji do jądra czynnika transkrypcyjnego NFκB [32]. RAGE jest receptorem wieloligandowym z rodziny immunoglobulin, który wiąże także β-amyloid, amfoterynę (czynnik neurotroficzny) i S100A12 [28, 29].

http://rcin.org.pl

Oprócz S100B, troficzne działanie wykazują też S100A1 [30, 33] i S100A4 [51]. W przypadku S100A1 zachodzi aktywacja szlaku sygnałowego cdc42/Rac, a w przypadku S100A4 aktywacja szlaku kinaz ERK1/2. Wykazano także, że S100A12 podane do hodowli neuronów wyizolowanych z hipokampa zarodka szczura dodatnio wpływa na wydłużenie neurytów [46]. Działanie S100A12 zachodzi prawdopodobnie za pośrednictwem receptora RAGE, kinaz MAP, fosfolipazy C oraz kinazy białkowej C. Przedstawione wyniki odnoszą się do nanomolowych stężeń białka S100 i wskazują, że białka S100 mogą odgrywać rolę w rozwoju i regeneracji układu nerwowego.

Z kolei, S100B podane komórkom w stężeniu mikromolowym wywołuje efekty toksyczne. I tak wykazano, że S100B indukuje apoptozę neuronów w hodowli [31, 44], a w indukcji tego procesu pośredniczy receptor RAGE. Po związaniu się S100B z receptorem RAGE następuje wzrost stężenia reaktywnego tlenu w komórce, uwalnianie cytochromu c i aktywacja kaskady kaspaz oraz hamowanie ekspresji Bcl-2 [33]. W innych badaniach wykazano, że podanie S100B do mieszanej hodowli neuronów i gleju stymuluje w astrocytach poziom mRNA indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) oraz podwyższenie aktywności tego enzymu, co w efekcie prowadzi do śmierci komórek [30].

Działanie białka S100B można porównać do działania cytokiny, która stosowana w niskich stężeniach ma działanie troficzne, a w wyższych stężeniach – działanie toksyczne (ryc. 3). Jako cytokina, białko S100B mogłoby również pełnić funkcję w stanach zapalnych układu nerwowego, kończących się zaburzeniami podobnymi do tych, jakie obserwuje się w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, w tym np. w chorobie Alzheimera [22].



RYCINA 3. Zewnątrzkomórkowa funkcja białka S100B w układzie nerwowym: nM – nanomolowe stężenie S100B, μM – mikromolowe stężenie S100B

http://rcin.org.pl

PODSUMOWANIE

Białka S100 to białka o niskiej masie cząsteczkowej, mające dwa motywy *EF-hand* wiążące jony Ca^{2+}. Białka S100 występują w określonych komórkach i tkankach, a w komórkach zmienionych chorobowo obserwuje się na ogół zwiększony poziom tych białek. Sekwencje aminokwasowe białek S100 są identyczne w 30–60%. Pierwsze dwa białka S100, tj. S100A1 i S100B znane są już od dawna, bo odkryto je ponad 30 lat temu. Pozostałe białka z tej grupy zidentyfikowano w ostatnim dziesięcioleciu. Jak przedstawiono w niniejszym artykule, białka S100 mogą pełnić wiele różnorodnych funkcji w komórce, a także uczestniczą w procesach związanych z komunikacją międzykomórkową. Udział białek S100 w wielu procesach sugeruje, że mogą one wpływać na różne szlaki przekazywania sygnału w komórce. Prace nad białkami S100 prowadzone są w wielu laboratoriach na świecie i dostarczają coraz to nowych informacji na temat ich występowania i funkcji. Wydaje się zatem, że jest to szczególnie ciekawa i ważna, z punktu widzenia funkcjonalnego, grupa białek wiążących wapń.

PIŚMIENNICTWO

[1] BAUDIER J, BERGER E, BERTACCHI N, WEINTRAUB H, GAGNON J, GARIN J. Interaction of bHLH transcription factors with calcium-binding calmodulin and S100a(αα) proteins. *Biochemistry* 1995; **34**: 7834–7846.

[2] BAUDIER J, DELPHIN C, GRUNWALD D, KHOCHBIN S, LAWRENCE JJ. Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and S100β binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11627–11631.

[3] BAUDIER J, GLASSER N, GERARD D. Calcium and Zinc-binding properties of bovine brain S100αα, S100a (αβ) and S100b (ββ) protein: Zn^{2+} regulates Ca^{2+} binding on S100b protein. *J Biol Chem* 1986; **261**: 8192–8203.

[4] BHATTACHRYYA A, OPPENHEIM RW, PREVETTE D, MOORE BW, BRACKENBURY R, RATNER N. S100 is present in developing chicken neurons and schwann cells and promotes motor neuron survival *in vivo*. *J Neurobiology* 1992; **23**: 451–466.

[5] CALABRETTA B, VENTURELLI D, KACZMAREK L, NARNI F, TALPAZ M, ANDERSON B, BERAN M, BASERGA R. Altered expression of G1-specific genes in human malignant myeloid cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 1495–1498.

[6] CECCALDI B, GROHOVAZ F, BENFENATI F, CHIEREGATTI E, GREENGARD P, VALTORATA F. Dephosphorylated synapsin I anchors synaptic vesicles to actin cytoskeleton: an analysis by video microscopy. *J Cell Biol* 1995; **128**: 905–912.

[7] CICCARELLI R, IORIO PDI, BRUNO V, BATTAGLIA G, D'ALIMONTE I, D'ONOFRIO M, CACIAGLI F. Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotroic glutamate receptors enhances the release of Nerve Growth Factor and S100β protein from cultured astrocytes. *Glia* 1999; **27**: 275–281.

[8] DAVIES MPA, RUDLAND PS, ROBERTSON L, PARRY EW, JOLICOUER P, BARRACLOUGH. Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene* 1996; **13**: 1631–1637.

[9] DELOUME JC, ASSARD N, MBLELE GO, MANGIN C, KUWANO R, BAUDIER J. The S100A6 and S100A11 are specific target of the calcium and zinc-binding S100B protein *in vivo*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 35302–35310.

[10] DONATO R. S100 proteins. *Cell Calcium* 1986; **7**: 123–145.

http://rcin.org.pl

[11] DONATO R. Functional roles of S100 proteins, calcium binding proteins and the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1450**: 191–231.
[12] DUDA T, GORACZNIAK RM, SHARMA RK. Molecular characterization of S100A1-S100B protein in retina and its activation mechanism of bovine photoreceptor guanylate cyclase. *Biochemistry* 1996; **35**: 6263–6266.
[13] FILIPEK A, KUZNICKI J. Molecular cloning and expression of mouse brain encoding a novel protein target of calcyclin. *J Neurochem* 1998; **70**: 1793–1798.
[14] FILIPEK A, JASTRZĘBSKA B, NOWOTNY M, KUZNICKI J. CacyBP/SIP a calcyclin and Siah-1 Interacting Protein, binds EF-hand proteins of the S100 family. *J Biol Chem* 2002; **277**: 28848–28852.
[15] FILIPEK A, ZASADA A, WOJDA U, MAKUCH R, DĄBROWSKA R. Characterization of chicken gizzard calcyclin and examination of its interaction with caldesmon. *Comp Biochem Physiol* 1996; **113B**: 745–752.
[16] FUJII T, KUZUMANI N, OGOMA Y, KONDO Y. Effects of calcium-binding proteins on histamine release from permeabilized rat peritoneal mast cells. *Biol Pharm Bull* 1994; **17 (5)**: 581–585.
[17] GARBUGLIA M, BIANCHI R, VERZINI M, GIAMBANCO I, DONATO R. Anexin II_2-p11 (calpactin I) stimulates the assembly of GFAP in a calcium- and pH-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **208**: 901–909.
[18] GERKE V, MOSS SM. Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1357**: 129–154.
[19] GIMONA M, LANDO Z, DOLGINOV Y, VANDERKERCKOHOVE J, KOBAYASHI R, SOBIESZEK A, HELFMAN DM. Ca^{2+}-dependent interaction of S100A2 with muscle and non-muscle tropomyosins. *J Cell Sci* 1997; **110**: 611–621.
[20] GOEBELER M, ROTH J, VAN DEN BOS C, ADER G, SORG C. Increase of calcium levels in epithelial cells induce translocations of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochem J* 1995; **309**: 419–424.
[21] GOLITSINA NL, KORDOWSKA J, WANG C-LA, LEHRER SS. Ca^{2+} -dependent binding of calcyclin to muscle tropomyosin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **220**: 360–365.
[22] GRIFFIN WST, STANLEY LC, LING C, WHITE L, McLEOD W, PERROT LJ, WHITE III CL, AROZA C. Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down's syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7611–7615.
[23] HAGENS G, ROULIN K, HOTZ R, SAURAT JH, HELLMANN U, SIEGENHALER G. Probable interaction between S100A7 and E-FABP in the cytosol of human keratinocytes from psoriatic scale. *Mol Cell Biochem* 1999; **192**: 123–128.
[24] HAGLID KG, YANG Q, HAMBERGER A, BERGMAN S, WIDERBERG A, DANIELSEN N, S100β stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res* 1997; **753**: 196–201.
[25] HEIERHORST J, KOBE B, FEIL SC, PARKER MW, BENIANS GM, WEISS KR, KEMP BE. Ca^{2+}/S100 regulation of giant protein kinases. *Nature* 1996; **380**: 636–639.
[26] HEIERHORST J, MITHELHILL KII, MANN RJ, TIGANIS T, CZERNIK AJ, GREENGARD P, KEMP BE. Synapsins as major neural Ca^{2+}/S100A1-interacting proteins. *Biochem J* 1999; **334**: 577–583.
[27] HEIZMANN CW, COX AJ. New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca^{2+}-, Zn^{2+}- and Cu^{2+}-binding protein family. *BioMetals* 1998; **11**: 383–397.
[28] HOFMANN MA, DRURY S, FU C, QU W, TAGUCHI A, LU Y, AVILA C, KAMBHAM N, BIERHAUS A, NAWROTH P, NEURATH MF, SLATTERY T, BEACH D, McCLARY J, NAGASCHIMA M, MORSER, STERN JD, SCHMIDT AM. RAGE mediates a novel proinflamatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polipeptides. *Cell* 1999; **97**: 889–901.
[29] HORI O, BRETT J, SLATTERY T, CAO R, ZHANG J, CHEN JX, NAGASHIMA M, LUNDH ER, VIJAY S, NITECKI D, MORSER J, STERN D, SCHMIDT AM. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphoterin in developing nervous system. *J Biol Chem* 1995; **270**: 25752–25761.
[30] HU J, CASTETS F, GUEVARA JL, VAN ELDIK LJ. S100β stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2543–2547.
[31] HU J, FERREIRA A, VAN ELDIK LJ. S100β induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 1997; **69**: 2294–2301.
[32] HUTTUNEN HJ, FAGES C, RAUVALA H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19919–19924.

http://rcin.org.pl

[33] HUTTUNEN HJ, KUJA-PANULA J, SORCI G, AGNELETTI AL, DONATO R, RAUVALA H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through RAGE activation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 40096–40105.

[34] ILG EC, SCHAFER BW, HEIZMANN CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* 1996; **68**: 325–332.

[35] IWASKI Y, SHIOJIMA T, KINOSHITA M. S100β prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section. *J Neurol Sci* 1997; **151**: 7–12.

[36] KAWASAKI, NAKAYAMA HS, KRESTINGER RH. Classification and evolution of EF-hand proteins. *BioMetals* 1998; **11**: 277–295.

[37] KERKHOFF C, KLEMPT M, SORG C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta* 1998; **1448**: 200–211.

[38] KOMADA T, ARAKI R, NAKATANI K, YADA I, NAKA M, TANAKA T. Novel specific chemotactic receptor for S100L protein on guinea pig eosinophils. *Biochem Biophys Commun* 1996; **220**: 871–874.

[39] KRAJEVSKA M, TARABYKINA S, BRONSTEIN I, MATTLAND N, LOMONOSOV M, HANSEN K, GEORGIEV G, LUKANADIN E. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9852–9856.

[40] KREIG P, SCHUPPLER M, KOESTER R, MINCHEVA A, LICHTER, MARCS PF. Repetin (Rptn), a new member of the 'fused gene' subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 1997; **43**: 339–348.

[41] LEE SC, KIM I-G, MAREKOV LN, OKEEFE EJ, PARRY D, STEINERT PM. The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (crosslining) protein. *J Biol Chem* 1993; **268**: 12164–12176.

[42] LEONARD DG, ZIFF EB, GREENE LA. Identification of characterisation of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 3156–3167.

[43] MANDINOVA A, ATAR D, SCHAFER BW, SPIESS M, AEBI U, HEIZMANN CW. Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. *J Cell Sci* 1998; **111**: 2043–2054.

[44] MARGULIS A, PAZDNYAKOV N, SITRAMAYY A. Activation of bovine photoreceptor guanylate cyclase by S100 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 243–247.

[45] MARIGGIO MA, FILLE S, CALISSANO P, NICOLETTI I, FANO G. The brain protein S100ab induces apoptosis in PC12 cells. *Neuroscience* 1994; **60**: 29–35.

[46] MATSUZAWA SI, REED JC. Siah, SIP, Ebi collaborate in novel pathway for beta-cathenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001; **7**: 915–926.

[47] MIKKELSEN SE, NOVITSKAYA V, KRAJEVSKA M, BEREZIN V, BOCK E, NORRILD B, LUKANIDIN E, S100A12 protein is a strong inducer of neurite outgrowth from primary hippocampal neurons. *J Neurochem* 2001; **79**: 767–776.

[48] MILLWARD TA, HEIZMANN CW, SCHAFER BW, HEMMINGS BA. Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *EMBO J* 1998; **17**: 5913–5922.

[49] MURAO S, COLLART FR, HUBERMAN E. A protein containing the cystic fibrosis antigen is an inhibitor of protein kinases. *J Biol Chem* 1989; **264**: 8356–8360.

[50] NEWTON RA, HOGG N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the β_2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunology* 1998; **160**: 1427–1435.

[51] NOVITSKAYA V, GRIGORIAN M, KRAJEVSKA M, TARABYKINA SI, BRONSTEIN I, BEREZIN V, BOCK E E, LUKANIDIN E. Oligomeric forms of metastasis related Mts1 (S100A4) protein, stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2000; **275**: 41278–41286.

[52] OKAZAKI K, NIKI I, LIONO S, KOBAYASHI S, HIDAKA H. A role of calcyclin, a Ca^{2+}-binding protein, on the Ca^{2+}-dependent insulin release from the pancreatic β-cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 6149–6152.

[53] POZDNYAKOV N, GORACZNIAK R, MARGULIS A, DUDA T, SHARMA RK, YOSHIDA A, SITARAMAYYA A. Structural and functional characterization of retinal calcium-dependent guanylate cyclase activator protein (CD-GCAP): identity with S100β protein. *Biochemistry* 1997; **36**: 14159–14166.

[54] PRESLAND RB, BASSUK JA, KIMBALLI JR, DALE BA. Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilagrin. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 218–222.

http://rcin.org.pl

[55] PROPPER C, HUANG X, ROTH J, SORG C, NACKEN W. Analysis of MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two hybride system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation. *J Biol Chem* 1999; **247**: 183–188.
[56] RAYNAL P, POLLARD HB. Annexins: the problem of assesing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1197**: 63–93.
[57] SCHAFER BW, WICKI R, ENGELKAMP D, MATTEI MG, HEIZMANN CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of S100 calcium binding protein family. *Genomics* 1993; **25**: 638–643.
[58] SCOTTO C, DELOULME JC, ROUSSEAU D, CHAMBAZ E, BAUDIER J. Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4272–4281.
[59] SEEMANN J, WEBER K, GERKE V. Structural requirements for annexin I-S100C complex formation. *Biochem J* 1996; **319**: 123–129.
[60] SELINFREUND RH, BARGER SW, WELSH MJ, VAN ELDIK LJ. Antisense inhibition of glial S100β production results in alteration in cell morphology, cytoskeletal organization, and proliferation. *J Cell Biol* 1990; **111**: 2021–2028.
[61] SHEU F-S, HUANG FL, HUANG K-P. Differential responses of protein kinase C substrates (MARCKS, neuromodulin and neurogranin) phosphorylation to calmodulin and S100. *Arch Biochem Biophys* 1995; **316**: 335–342.
[62] SORCI G, AGNELETTI AL, BIANCHI R, DONATO R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1448**: 277–289.
[63] SORCI G, AGNELETTI AL, DONATO R. Effects of S100A1 and S100B microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience* 2000; **99**: 773-783.
[64] SORCI G, BIANCHI R, GIAMBANCO I, RAMBOTTI MG, DONATO R. Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-modulated proteins S100A1 and S100B. *Cell Calcium* 1999; **25**: 93–106.
[65] STRADAL TB, GIMONA M. Ca^{2+} -dependent association of S100A6 (calcyclin) with plasma membrane and the nuclear envelope. *J Biol Chem* 1999; **274**, 31593–31596.
[66] TAN JQ, VORUM H, LARSEN CG, MADSEN P, RASMUSSEN HH, GESSER B, ETZERODT M, HONORE B, CELIS JEK, THERSTRUP-PEDERSON K. Psoriasin: a novel chemotactin protein. *J Invest Dermatol* 1996; **107**: 5–10.
[67] THORDARSON G, SOUTHARD JN, TALAMANTES F. Purification and characterization of mouse decidual calcyclin: a novel stimulator of mouse placental lactogen-II secretion. *Endocrinology* 1991; **129**: 1257–1265.
[68] TONINI GP, CALASARO A, CARA A, Di MARTINO D. Inducible expression of calcycline, a gene with strong homology to S100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Shwann-like cell line. *Cancer Res* 1991; **51**: 1733–1737.
[69] TONINI GP, FABRETT G, KUZNICKI J, MASSIMO L, SCARUFFI P, BRISIGOTTI M, MAZZOCCO K. Gene expression and protein localisation of calcyclin, a calcium binding protein of the S-100 family in fresh neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1995; **31A**: 499–504.
[70] TRAVES S, SCUTARI E, ROBERT M, GROH S, OTTOLI M, PRESTIPINO G, RONJAT M, ZORZATO F. Interaction of S100A1 with the Ca^{2+} release channel (ryodanine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry* 1997; **36**: 11496–11503.
[71] TULCHINSKY E, KRAMENOV D, FORD HL, RESHETNYAK E, LUKANIDIN E, ZAIN S. Characteristion of a positive regulatory element in the mts1 gene. *Oncogene* 1993; **8**: 79–86.
[72] UOZUMI M, MURANO S, KATAYAMA N, KITAZAWA S, AMATSU M, MEADA S. Induction of S100A4 gene expression inhibits *in vitro* invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3. *Cancer Lett* 2000; **149**: 135–141.
[73] WANG G, RUDLAND PS, WHITE MR, BARRACLOUGH R. Interaction *in vivo* and *in vitro* of metastasis-including S100 protein, S100A4(p9Ka) with S100A1, *J Biol Chem* 2000; **275**: 11141–11146.
[74] WETERMAN MAJ, STOOPEN GM, van MUIJEN GNP, KUZNICKI J. RUITER DJ, BLOEMERS HPJ. Expression of calcyclin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice. *Cancer Res* 1992; **52**: 1291–1296.
[75] WILLS FL, McCUBBIN WD, KAY CM. Smooth muscle calponin-caltropin interaction: effect of biological activity and stability of calponin. *Biochemistry* 1994; **33**: 5562–5569.

http://rcin.org.pl

[76] WU T, ANGUS W, YAO X-L, LOGUN C, SHELHAMER JH. p11, a unique member of S100 family of calcium binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A_2. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17145–17153.
[77] XIONG ZG, O'HANLON D, BECKER LE, RODER J, MacDONALD JF, MARCS A. Enchanced calcium transient in glial cells in neonatal cerebellar cultures derives from S100B null mice. *Exp Cell Res* 2000; **257**: 281–289.
[78] YANG Q, O'HANLON D, HEIZMANN CW, MARCS A, Demonstration of heterodimer formation between S100B and S100A6 in the yeast two-hybride system and human melanoma. *Exp Cell Res* 1999; **246**: 501–506.
[79] YEN T, HARRISON CA, DAVERY JM, LEONG S, IISMAA SE, YOSHIMURA T, GECZY CL. Induction of the S100 chemotactic protein CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflamatory stimuli. *Blood* 1997; **90**: 4812–4821.
[80] ZHAO XQ, NAKA M, MUNEUKI M, TANAKA T. Ca^{2+}-dependent inhibition of actin-activated myosin ATPase activity by S100C (S100A11), a novel member of the S100 protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **267**: 77–79.
[81] ZIEGLER DR, INNOCENTE CE, LEAL RB, RODNIGHT R, GONCAVALES CA. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeleton fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res* 1998; **23**: 1259–1263.
[82] ZIMMER DB, CORNWALL EH, REYNOLDS PD, DONALD CM. S100A1 regulates neurite organization, tubulin levels, and proliferation in PC12 cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 4705–4711.

Redaktor prowadzący – L. Hryniewiecka

Otrzymano:01.09.2002 r.
Przyjęto:22.02.2003 r.
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: anfil@nencki.gov.pl

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

SPRAWOZDANIE ZARZĄDU FUNDACJI BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ ZA ROK 2002

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 8340344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl

Fundacja współpracowala z Polskim Towarzystwem Anatomicznym, Polskim Towarzystwem Histochemików i Cytochemików, Polskim Towarzystwem Biologii Komórki oraz Siecią Biologii Komórki UNESCO. Potrzeby finansowe konieczne do działalności statutowej Fundacji były wypracowane wydawaniem czasopism i ich sprzedażą oraz były wspierane przez dotację z Komitetu Badań Naukowych.

W bieżącym roku został powołany Sąd Rejestracyjny w Warszawie, który zarządził ponowną rejestrację wszystkich organizacji społecznych, w tym również naszej Fundacji. Sąd dopatrzył się nieprawidłowości w tym, że Zarząd składa się z 3 osób: prezesem jest J. Kawiak, sekretarzem jest M. Zabel i skarbnikiem – Joanna Liwska. Statut przewiduje 5 osób w Zarządzie. Sąd warunkował ponowną rejestrację Fundacji wyborem dodatkowych 2 członków Zarządu, co dokonała Rada Fundacji. Wybrano członkami Zarządu prof. dr hab. Barbarę Bilińską i prof. dr hab. Jana Litwina. Kopię postanowienia Sądu o ponownej rejestracji (pod numerem KRS 0000137131) wysłano do Członków Założycieli Fundacji oraz do prof. dr hab. J.Kałuży. Skład Rady Fundacji nie zmienił się i przewodniczącą była Zofia Osuchowska.

Działania Fundacji dotyczyły wydawania czasopism naukowych: „Folia Histochemia et Cytobiologica" oraz „Postępy Biologii Komórki". Redakcje czasopism dysponują funduszami na oddzielonych kontach bankowych i samodzielnie gospodarują tymi funduszami. Rozliczenia finansowe są prowadzone przez wspólną księgową, którą jest p. Celina Adamczyk. Raz w roku kontrolę działalności finansowej i merytorycznej Fundacji kontrolują Fundatorzy.Kontrola nie znalazła uchybień w prowadzeniu Fundacji przez Zarząd. Praca czlonków Rady Redakcji, Członków Założycieli oraz Zarządu jest pracą społeczną, podobnie jak praca Redaktorów obu czasopism. Praca Redaktorów jest bardzo odpowiedzialną i często wymaga wielu godzin. Zarząd składa serdeczne podziękowania Redaktorom za ich trud i czas poświęcony pracy dla autorów oraz czytelników obu czasopism.

http://rcin.org.pl

„Folia Histochemica et Cytobiologica" ukazuje się regularnie. Zeszyt zwykle zawiera artykuł przeglądowy oraz prace oryginalne. Współredaktorami i recenzentami są wybitni naukowcy w kraju i zagranicą. Czasopismo jest indeksowane w: Medline, Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert. Impact Factor podniósł się z IF =0,289 w roku 1998 do IF = 0,598 za rok 2001 (opublikowane w lipcu 2002). Szata zewnętrzna czasopisma nie ustępuje najlepszym ukazującym się obecnie czasopismom naukowym. Streszczenia w języku angielskim artykułów publikowanych w *Folia Histochemia et Cytobiologica* są dostępne na oficjalnej stronie internetowej czasopisma, pod adresem www.cm-uj.krakow.pl/FHC. Adres e-mailowy Redaktora: mmlitwin@cyf-kr.edu.pl

Kolejne zeszyty „Postępów Biologii Komórki" ukazywały się w minionym roku na początku każdego kwartału. Zeszyty zawierały od 10 do 11 artykułów przeglądowych recenzowanych. Lista recenzentów rocznika czasopisma jest publikowana w 1 i 2 zeszycie następnego roku. Ponadto wydano 2 suplementy, nr 19 i 20. Suplement nr 19 zawiera informacje o regulacji cyklu komórkowego i był wydany w związku z 30 konferencją biologii komórki w Warszawie, tzw. szkółką biologii komórki. Suplement 20 zawiera informacje z zakresu komórkowych zjawisk biologii rozrodu. Czasopismo jest na liście Copernicus, gdzie ma 5,96 punktów oraz jest notowane przez National Library of Medicine,Bethesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich's Intern.Periodicals Directory, New Jersey, USA oraz Instytut Naucznoj Techniczeskoj Informacji, Moskwa, Rosja. Rozprowadzanie „Postępów" jest prowadzone bez pośredników, przez Redakcję. Wszelkie zgłoszenia prenumeraty ew. indywidualne zapotrzebowania na pojedyncze zeszyty mogą być przesłane pocztą e-mailową na adres: jkawiak@cmkp.edu.pl. Streszczenia w języku polskim i j.angielskim artykułów ukazujących się w „Postępach" są dostępne pod adresem: www.pbkom.pl. Redakcja podjęła decyzję, że artykuły publikowane w „Postępach" będą od stycznia 2003 r. obciążone opłatą 300.- zł za artykuł.

Koszty wydawania obu czasopism wzrosły w ostanim okresie, dlatego Redakcje muszą bardzo rozsądnie liczyć koszty. Na szczęście dotąd udawało się uniknąć zaciągania długów przez Fundację, która ma niewielki bilans dodatni.

za Zarząd Fundacji
Jerzy Kawiak

http://rcin.org.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

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

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 przesyłać 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. 401) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings* (*Index Medicus*), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. 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	*tak*	*nie*	Treść pracy nie była uprzednio publikowana, nie została wysłana do innej redakcji	*tak*	*nie*
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	*tak*	*nie*	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z		
Jest zgodaosób, których informacje nie-publikowane są zamieszczone w tekście	*tak*	*nie*	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 „Postępach Biologii Komórki" przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 30, 2003 NR 2 (217–402)
ADVANCES IN CELL BIOLOGY VOL.30, 2003 NR 2 (217–402)

TREŚĆ – CONTENTS

W tym zeszycie PBK 217

ONISZK M., BARBACKA-SUROWIAK G.: Udział układu serotoninowego w funkcjonowaniu zegara biologicznego ssaków
Participation of serotonergic system in function of mammalian circadian clock 219

GRZELAK A., JANISZOWSKA W.: Występowanie i biosynteza triterpenoidów w warunkach *in vitro*
Triterpenoids occurrence and their biosynthesis in cultures *in vitro*. 229

RACZYŃSKA K.D., AUGUSTYNIAK H.:Wpływ dojrzewania mitochondrialnych transkryptów roślin na ich stabilność
The influence of the 3' end processing of plant mitochondrial transcript on their stability 243

SĄSIADEK M., SCHLADE-BARTUSIAK K. STEMBALSKA-KOZŁOWSKA A., BIELAWSKA-POHL A., ŚMIGIEL R., DUŚ D: Niestabilność genetyczna w nowotworach. I. Niestabilność chromosomowa w nowotworach
Genetic instability in cancer. I. Chromosomal instability in cancer 259

KRZYŻOWSKA M., NIEMIAŁTOWSKI M.:Supresja apoptozy w zakażeniach chordopokswirusami
Supression of apoptosis in chordopoxvirus infections 273

CIARA E., POPOWSKA E., KRAJEWSKA-WALASEK M.:Zespół Smitha, Lemlego i Opitza w badaniach klinicznych, biochemicznych i molekularnych
Smith, Lemli, Opitz syndrome in clinical, biochemical and molecular studies 293

RESZEĆ J., SULKOWSKA M. GUZIŃSKA-USTYMOWICZ K., ZALEWSKA R., SULKOWSKI S.: Wirus brodawczaka ludzkiego a proces apoptozy
Human Papillomavirus and apoptosis 311

OLAS B., WACHOWICZ B.: Rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi
Role of reactive oxygen species in blood platelets 325

WIŚNIEWSKA A., FILIPECKI M.: Wyciszanie genów jako strategia badania ich funkcji w rślinach – Gene silencing as a strategy for analysis of gene function in plants 339

SZUMIEL I.: Układ nadzorujący genom – Genome surveillance system 359

KURZAWA R., STARCZEWSKI A., BĄCZKOWSKI T.: Implantacja zarodka
Embryo implantation 375

JASTRZĘBSKA B., FILIPEK A.:Funkcja białek wiążących jony Ca^{2+} z rodziny S100
Function of calcium binding proteins of the S100 family 383

Sprawozdanie Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za rok 2002 399

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK oraz Warunki prenumeraty 401

Indeks 369705

http://rcin.org.pl