

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 31, ISSUE 4/2004
(629–764)

Postępy Biologii Komórki

Advances in Cell Biology

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

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

Janusz KUBRAKIEWICZ – biologia rozwoju, embriologia, różnicowanie komórek, cytoszkielet – developmental biology, embryology, cell differentiation, cytoskeleton – *Instytut Zoologiczny UW, 50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21*

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, 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 addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 11,0. Ark. druk.8,5. Podpisano do druku w listopadzie, a druk ukończono w grudniu 2004.

W tym Zeszycie PBK

Hipotezy opisujące zasady funkcjonowania układu sygnałowego aktywacji mitozy oraz punktów kontrolnych cyklu komórkowego opisano na stronie 631 i dalszych. Podobne problemy były dyskutowane wcześniej w "Postępach" w związku z Nagrodą Nobla 2001 dla L.Hartwella, P. Nurse'a i T.Hunta (PBK 2002; 29, 157–175).

Trójniciowy DNA może powstać w wyniku swoistych oddziaływań jednoniciowych oligonukleotydów z sekwencjami dwuniciowego DNA. Istnieje wiele potencjalnych zastosowań strategii indukcji struktur trójniciowych przez te cząsteczki. Więcej na ten temat jest na stronie 647.

ALCAM/166 jest adhezyjną cząsteczką występującą na powierzchni komórek prawidłowych i nowotworowych. W trakcie rozwoju raka prostaty, czerniaka złośliwego czy raka piersi komórki początkowo mają większą ekspresję CD166, a potem ją tracą. Opis tych zachowań komórek jest na stronie 663.

Opis niektórych mechanizmów molekularnych związanych z różnicowaniem się komórek pączka ogonowego jest na stronie 681.

W ostatnich latach zwraca się większą uwagę na możliwość użycia roślin do usuwania lub inaktywacji zanieczyszczeń gleby i wód powierzchniowych. Rośliny mogą chelatować jony metali, które przedostają się do ich cytoplazmy. Te kompleksy są potem transportowane do wakuoli (patrz strona 717).

KOMÓRKOWE SYSTEMY REGULACYJNE. MECHANIZMY SPRZEŻEŃ ZWROTNYCH I ZALEŻNOŚĆ SUBSTRAT-PRODUKT W CYKLU KOMÓRKOWYM*

CELLULAR REGULATORY SYSTEMS. MECHANISMS OF FEEDBACK
LOOPS AND SUBSTRATE-PRODUCT DEPENDENCY
IN THE CELL CYCLE

Dorota RYBACZEK i Janusz MASZEWSKI

Katedra Cytofizjologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Prawidłowa kolejność zdarzeń w przebiegu cyklu komórkowego nadzorowana jest przez skomplikowany mechanizm molekularny, w którym punkty kontrolne pełnią funkcję szlaków transdukcji sygnału uruchamianych zarówno po wykryciu zaburzeń w montażu struktur komórkowych, jak i w prawidłowym przebiegu kolejnych etapów interfazy i mitozy. System tych punktów we właściwym czasie włącza i wyłącza kluczowe enzymy sterujące cyklem komórkowym, a wszelkie sygnały o zakłóceniach czynności lub strukturalnych uszkodzeniach zamienia w reakcje blokujące syntezę DNA lub hamujące inicjację podziału komórki. Ten właśnie fakt jest powodem zdominowania eksperymentalnych prac nad mechanizmami kontrolującymi przebieg cyklu komórkowego przez biologię związaną z medycyną. Szlaki sygnałowe i ich wzajemne połączenia tworzą sieć przenoszącą informacje ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki wzbudzając odpowiedź na poziomie biochemicznym lub fizjologicznym. W artykule przedstawiono najnowsze hipotezy opisujące zasady funkcjonowania: (1) systemu sygnałowego aktywacji mitozy, w którym pośredniczy fosfataza Cdc25 oraz (2) punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Sugerują one, że inicjacja mitozy jest procesem wykazującym cechy układu bistabilnego, podczas gdy punkty kontrolne funkcjonują, prawdopodobnie, dzięki mechanizmom pozytywnych i podwójnie-negatywnych pętli sprzężeń zwrotnych, a także systemowi zależności typu substrat-produkt.

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, punkty kontrolne, sprzężenia zwrotne, zależność substrat-produkt.

Summary: Temporal ordering of events in the cell cycle is directed by a highly sophisticated control system. Their checkpoints are signal-transduction pathways specific for either abnormaly or incompletely assembled cellular structures. Since the main role of all these checkpoints is to make a decision,

*Praca finansowana w części z funduszy grantu KBN 3 PO4C 030 24.

whether or not the cell division cycle has to be continued, particular elements of these control mechanisms deserve special attention as promising targets for pharmacological treatment of cancer. Signalling pathways are interconnected and form a complex network that carries information from the outside to the inside of the cell and, then, execute biochemical or physiological responses. Here we review recent advances in our understanding of the higher-order biological functions of (1) the natural, well-known signaling system responsible for the Cdc25-mediated activation of mitosis, and (2) the basic properties of the cell cycle checkpoints. Initiation of mitosis has been shown to exhibit bistable responses, while cell cycle checkpoints have been shown to function as an oscillator with positive, double-negative feedback loops and substrate-product dependencies.

Key words: cell cycle, cell cycle checkpoints, feedback loops, substrate-product dependency.

WSTĘP

Wśród tysięcy różnych typów cząsteczek, których kompleksy budują komórki żywych organizmów, składnikiem uprzywilejowanym jest podstawowy nośnik informacji genetycznej – podwójna helisa kwasu deoksyrybonukleinowego. Cząsteczki DNA wchodzące w skład genomu stanowią podstawę piramidy złożonej z wszystkich poziomów struktury komórki; decydują o jej właściwościach, a zarazem o właściwościach całego organizmu. Warunkują jego zdolność do odtwarzania elementów zużytych i uszkodzonych, a także własne powielanie się, utrzymując zarazem pokoleniową ciągłość gatunku. Chociaż inne składniki komórki pełnią jedynie rolę czynników wykonawczych, genom jądrowy – bez otaczającej go cytoplazmy – nie jest zdolny do przejawiania jakiegokolwiek ze swych licznych funkcji. Komórka jest zatem elementarną jednostką życia, jako nośnik zdolności przyswajania i przetwarzania materii, wzrostu i reprodukcji. Chociaż ostatecznym kresem analizy genetycznej jest gen, nie cechuje go jednak autonomia; najczęściej wyraża się on w sposób zależny od ekspresji własnej i białkowych produktów innych genów. Rozwój, formę i właściwości organizmu wyznacza więc całość materiału genetycznego – urzeczywistniona w komórce i organizmie szczególnie kombinacja genów, systemów regulacji ich transkrypcji i sekwencji niekodujących.

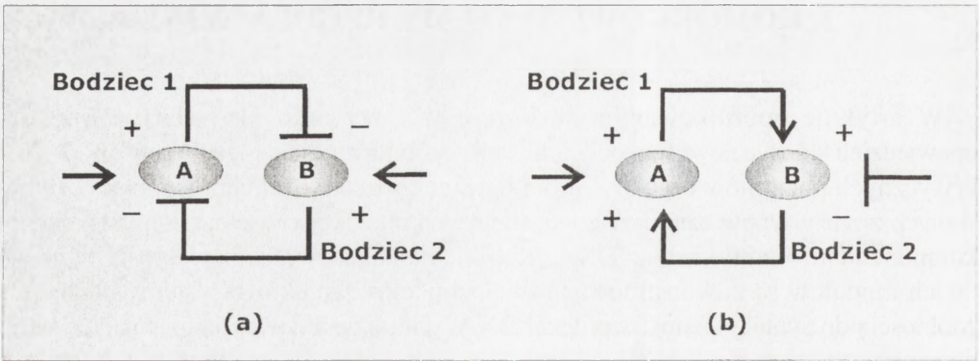
Zrozumienie fizjologii żywych komórek poprzez opracowanie metod funkcjonalnej interpretacji treści zakodowanych w genomie jest najważniejszym lub wręcz ostatecznym celem biologii molekularnej. Rozmiary tego przedsięwzięcia są ogromne, a jego realizacja wiąże się z podjęciem badań nad procesem wieloetapowym, którego pierwszym poziomem jest tłumaczenie sekwencji nukleotydowych na język sekwencji aminokwasów. Dopiero wówczas, liniowo zestawione grupy aminokwasowe rozpocząć mogą proces formowania trójwymiarowych cząsteczek białkowych. Właściwości białka i możliwość przenoszenia funkcji na złożone sieci wzajemnie na siebie oddziałujących makrocząsteczek określone są przez ostateczny kształt tych molekuł. Ich skoordynowane funkcjonowanie determinuje – z kolei – fizjologiczne właściwości komórek żywych [34].

1. KOMÓRKOWE SYSTEMY REGULACYJNE

W artykule opublikowanym w *Nature* w 1999 roku [15] Hartwell i wsp. opowiedzieli się za celowością podejmowania prób identyfikacji „modułów” w obrębie krytycznych poziomów organizacji biologicznej – funkcjonalnych jednostek zbudowanych z wielu typów cząsteczek, kształtujących interaktywne związki między takimi komponentami komórki, jak: DNA, RNA i białka. Dowodami realności istnienia takich modułów są zrekonstruowane *in vitro* wieloskładnikowe systemy obdarzone zdolnością do syntezy białek, replikacji DNA, glikolizy, a nawet formowania struktur wrzeciona podziałowego [20].

Większość reakcji biochemicznych zachodzących w komórce ma charakter odwracalny. Białka ulegają procesom fosforylacji i defosforylacji, białka G oscylują między formą związaną z GTP lub stanem zależnym od GDP, wtórne przekaźniki są syntetyzowane i degradowane lub uwalniane i sekwestrowane, białka importowane są do jądra komórkowego lub eksportowane poza jego obszar. Nawet proteoliza jest – w pewnym sensie – procesem odwracalnym, ponieważ ubytki białek zdegradowanych mogą być kompensowane syntezą ich cząsteczek *de novo*. Nie oznacza to, oczywiście, że istnieją wyłącznie transformacje odwracalne. Okresem względnej stabilności komórki jest jej stan zróżnicowania; trwa on lata lub dekady, aż do momentu pojawienia się bodźca przełączającego systemy regulacyjne komórki w taki sposób, że inicjuje ona drogę „powrót” do stanu odróżnicowanego, fizjologicznie bliskiego jej macierzystym formom pierwotnym [7].

Wśród czterech faz, jakie tradycyjnie wyróżnia się w cyklu komórkowym, dwie mają znaczenie szczególne. Jest to faza S – okres replikacji DNA oraz faza M mitozy – okres rozdziału podwojonego materiału genetycznego do jąder komórek potomnych w taki sposób, aby pod względem zawartości i jakości materiału genetycznego były one identyczne z jądrem komórki macierzystej. Przykładem na nieodwracalność transformacji w przebiegu cyklu komórkowego jest przejście z fazy G_2 do mitozy (fazy M). Po zainicjowaniu podziału mitotycznego, komórki nie są już w stanie powrócić do fazy G_2 (do nielicznych wyjątków należą jądra komórkowe ulegające endomitozie [12] oraz profazowe komórki PtK₁ salamandry hodowane w warunkach *in vitro*, w których odwracalnie indukowano powrót do antefazy na skutek schłodzenia do temperatury 20°C [28]). Jak zatem wyjaśnić fakt, że procesy odwracalne, aktywujące szlaki sygnałowe komórek, prowadzą do zmian determinujących ich losy w sposób nieodwracalny? Pytanie to staje się szczególnie trudne, gdy uświadomimy sobie, że procesy fosforylacji i defosforylacji mierzone są w skali minut, istnienie białek zaś – w skali godzin [7]. Wyjaśnienie kryje się prawdopodobnie gdzieś w teorii Monoda i Jacoba – w specyficznych obwodach transdukcji sygnału, zdolnych „zapamiętać” choćby przejściowo tylko funkcjonujący bodziec „różnicowania” jeszcze długo po ustąpieniu jego działania. Każdy z tych obwodów, zbudowany w komórkach prokariotycznych z dobrze poznanych elementów regulacyjnych, stanowi odmianę pętli podwójnie-ujemnych sprzężeń zwrotnych (ryc. 1a). Pętle takie



RYCINA 1. Dwustabilność systemów transdukcji sygnału. (a) Pętla podwójnie-ujemnego sprzężenia zwrotnego. Białko A blokuje białko B, natomiast białko B blokuje białko A. Stan stabilny osiągany jest wtedy, gdy białko A ulega ekspresji, a białka B nie ma lub jest nieaktywne, a także wówczas gdy białko B ulega ekspresji, a nie ma białka A lub jest, ale nieaktywne. Stan stabilny nie może być osiągnięty, jeśli obydwa białka są aktywne lub obydwa są nieaktywne. W tego typu pętli wahania między stanem aktywnym białka A lub stanem aktywnym białka B wynikać mogą z bodźcowego działania czynników modyfikujących stan elementów w układzie sprzężeń zwrotnych. (b) Pętla pozytywnego sprzężenia zwrotnego. W tym przypadku, białko A aktywuje białko B, a białko B aktywuje białko A. Powstający wówczas stan stabilny charakteryzować się może aktywnością lub brakiem aktywności obu białek (A i B), jednak nie może być skutkiem aktywności wyłącznie jednego z nich. Obydwa rodzaje sprzężeń zwrotnych stanowią przyczynę samonapędzających się odpowiedzi komórkowych, utrzymujących się długo po zaprzestaniu działania bodźca (rysunek na podstawie [7], zmodyfikowany)

umożliwiają pojawienie się fazy stabilizacji jednego z dwóch stanów alternatywnych (albo *A*, albo *B*), trwającej do chwili zadziałania bodźca wymuszającego zmianę stanu. Powstający wówczas system regulacyjny formuje układ dwustabilny. Tego typu obwody, złożone z pętli podwójnie ujemnych sprzężeń zwrotnych, stanowiły podstawę hipotezy tłumaczącej istotę samoutrzymujących się (*self-sustaining*) wzorów ekspresji genów. Obecnie, dzięki znajomości licznych modyfikacji potranslacyjnych, z równym powodzeniem mogą one wyjaśniać formowanie się analogicznych układów sterujących aktywnością białek. Samoutrzymujące się wzory ekspresji genów lub aktywności białek kształtować mogą także dodatnie sprzężenia zwrotne (ryc. 1b). W takim przypadku, system oscyluje między stanem, w którym działają obydwa jego elementy (*A* i *B*) albo nie działa żaden (ani *A*, ani *B*).

Powstanie układu dwustabilnego wiąże się z formowaniem dwóch rodzajów sprzężeń zwrotnych: dodatniego (ryc. 1a), podwójnie ujemnego (ryc. 1b), a także z wystąpieniem reakcji o charakterze autokatalitycznym. Istnienie samych tylko pętli sprzężeń zwrotnych nie gwarantuje osiągnięcia dwustabilności [9]. W systemie pętli sprzężeń zwrotnych musi pojawić się nieliniowość, wynikająca z kooperacyjnej, „ultrawrażliwej” reakcji enzymów na oddziaływania regulatorów nadrzędnych. Siła każdego z obu elementów formujących pętlę sprzężenia zwrotnego musi być zrównoważona; jeśli będzie zbyt mocna lub zbyt słaba, doprowadzi jedynie do powstania układu jednostabilnego. Osiągnięcie dwustabilności nie gwarantuje jednak

nieodwracalności procesów komórkowych. Układ taki wykazuje zawsze pewien stopień histerezy, co oznacza, że jego przełączenie z jednego stanu w drugi jest trudniejsze niż utrzymanie go w stanie już zmienionym.

Analiza modularna, obejmująca różne poziomy organizacji biologicznej, począwszy od zbiorowisk cząsteczek poprzez systemy komórkowe aż do poziomu całego organizmu, a nawet populacji wielogatunkowych – wkrótce stać się może niezbędnym narzędziem w poszukiwaniach wyjaśnień funkcjonalnych. Obecnie jest nowym wyzwaniem intelektualnym, pomaga w formułowaniu hipotez i ich weryfikacji. Prace eksperymentalne nad konstrukcją prostych, sztucznych systemów dwustabilnych prowadzone są w laboratoriach wykorzystujących transgenezę komórek bakterii (*E. coli* [11]) i drożdży (*S. cerevisiae* [2]) o zsekwencjonowanych genomach. Najlepiej poznanym, naturalnym systemem białkowym, funkcjonującym w procesie transdukcji sygnału jako przełącznik dwustabilny, jest kaskada reakcji aktywowanych kinazą MAP (kaskada MAPK; *mitogen-activated protein kinase*) w oocytach *Xenopus laevis* stymulowanych progesteronem. Kaskada ta uruchamiana jest z chwilą indukcji procesu dojrzewania oocytów. Wychodzą one wówczas z długotrwałego stanu bloku w fazie G₂, kończą pierwszy podział mejotyczny i ponownie zatrzymują się w metafazie II podziału mejotycznego, wyposażone w aktywną formę kinazy Cdk1 i aktywną kinazę p42 MAPK [24]. Dojrzewanie oocytów ma charakter nieodwracalny, a jego indukcja przebiega zgodnie z zasadą „wszystko, albo nic” [25]. Komórki poddane stymulacji hormonalnej albo dojrzewają, pozbawione odtąd możliwości rewersji do stanu poprzedniego, albo trwają w stanie niezmienionym. Tak więc, jeden z wielu poziomów regulacyjnych, funkcjonujących w kaskadzie MAPK, przekształcać musi stopniowo nasilające się działanie bodźcowe progesteronu w reakcję o skutku nieodwracalnym, determinującym ostatecznie los komórki.

1.1. System regulacyjny inicjacji mitozy

Rozważania na temat systemów sprzężeń zwrotnych, przeniesione na płaszczyznę funkcjonalnej organizacji komórek wyższych Eukaryota, nieuchronnie prowadzić muszą do jednego z najbardziej skomplikowanych układów regulacyjnych, już od dawna uznawanego za potencjalnie dwustabilny. Potencjalnie, ponieważ kwestii tej nie rozstrzygnęły jeszcze ostatecznie dowody eksperymentalne [7]. Chodzi o proces formowania i aktywacji MPF (*M-phase Promoting Factor* lub *Maturation Promoting Factor*) – kompleksu cyklinozależnej kinazy Cdk1 (*cyclin-dependent kinase 1*, znanej także jako Cdc2 oraz p34^{cdc2}) z cykliną B, indukującego przejście z interfazy do mitozy. Wydaje się rzeczą niemal bezsporną, że sprzężenia zwrotne w biochemicznym systemie aktywacji MPF tworzą molekularny aparat przełącznikowy, natomiast nieodwracalność przejścia G₂→M jest prawdopodobnie konsekwencją mechanizmu jego działania.

Aktywacja MPF to dość dobrze poznany, wieloetapowy proces, rozpoczynający się w chwili połączenia enzymatycznie nieaktywnego monomeru kinazy Cdk1 z jej podjednostką regulatorową – cykliną B (m.in. [18, 33]). Przed rozpoczęciem mitozy, w wyniku fosforylacji katalitycznej części Cdk1 na treoninie 14 (T14) i tyrozynie 15

(Y15), kompleks Cdk1-cyklina B utrzymywany jest w stanie nieaktywnym. Inhibicyjne fosforylacje Cdk1 katalizowane są przez białkową kinazę Wee1 (fosforylującą Y15) oraz Myt1 (fosforylującą zarówno T14, jak i Y15 [18]). W trzeciej, aktywującej fosforylacji uczestniczy kinaza CAK (*Cdk activating kinase*; kompleks kinazy Cdk7 i cykliny H) [31]. Przenosi ona grupę fosforanową na treoninę 161 (T161), zmieniając zarazem konformację kinazy Cdk1 w obrębie tzw. pętli T. Odslonięta zostaje wówczas kieszeń wiążąca ATP, co umożliwia przeniesienie pojedynczej grupy fosforanowej na jedną z hydroksylowych grup w białkowym substracie kompleksu MPF. Przejawienie się jego właściwości enzymatycznych, bezpośrednio związane z inicjacją mitozy, nastąpić może jednak dopiero po defosforylacji kinazy Cdk1 przez fosfatazę o podwójnej specyficzności – Cdc25C (cyt. za [4]).

Podstawowe właściwości pętli sprzężeń zwrotnych opisanego tu systemu regulacyjnego, ujawnione zostały w serii doświadczeń przeprowadzonych na modelu cytoplazmatycznych ekstraktów komórek jajowych *Xenopus* [32]. Badania te wykazały, że w ekstraktach „interfazowych”, zawierających nieaktywne kompleksy Cdk1-cyklina B, szybkość inhibicyjnej fosforylacji Y15 jest wysoka, a tempo defosforylacji – stosunkowo niskie. W ekstraktach „mitotycznych”, wyposażonych w aktywne kompleksy kinazy Cdk1-cyklina B, tempo inaktywującej fosforylacji tyrozyny 15 w cząsteczkach kinazy jest niskie, natomiast szybkość defosforylacji – wysoka. Tak więc, w sposób pośredni lub bezpośredni, kompleks MPF pobudza katalityczne właściwości swojego aktywatora, formując pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego. Równocześnie blokuje działanie własnego supresora, tworząc – tym razem – pętlę sprzężenia zwrotnego o charakterze podwójnie-ujemnym. Wyrażając to samo w symbolach enzymów katalizujących poszczególne reakcje: aktywacja Cdk1 na początku mitozy jest efektem jednoczesnego blokowania Wee1 i Myt1 oraz stymulacji Cdc25C.

Aktywacja fosfatazy Cdc25C wiąże się z fosforylacją kilku jej reszt aminokwasowych w N-końcowym odcinku cząsteczki. W procesie tym uczestniczą co najmniej dwie kinazy. Jedną z nich jest kompleks Cdk1-cyklina B1 (tworząc wraz z Cdc25C opisane już dodatnie sprzężenie zwrotne), drugą – Plk1 (*Polo-like kinase* Δ). Homolog Plk u *Xenopus* – Plx1 – fosforyluje i aktywuje Cdc25C *in vitro* i jest niezbędnym czynnikiem aktywacji Cdc25C zarówno w komórkach jajowych, jak i w bezkomórkowych ekstraktach cytoplazmatycznych [21, 29]. Wszelkie cechy prawdopodobieństwa wydaje się więc mieć następujący łańcuch zdarzeń: początkowa, być może częściowa aktywacja Cdc25C, dokonująca się prawdopodobnie przy udziale Plk1, prowadzi do całkowitego zaktywowania kompleksów Cdk1-cyklina B. Pierwsza pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego może być dodatkowo wzmocniona zdolnością MPF do inaktywującej fosforylacji kinaz Wee1 [22] i Myt1 [23].

Aktywacja Cdk1 w ekstraktach komórek jajowych *Xenopus*, a także inicjacja mitozy w licznych liniach komórek zwierzęcych prowadzą do kolejnych podwójnie-ujemnych sprzężeń zwrotnych, wynikających z pobudzenia katalitycznych funkcji kinazy p42 MAPK. Efektem jej aktywacji jest zwolnienie tempa destrukcji cyklin [35] i zablokowanie inhibicyjnej wobec Cdk1 aktywności kinazy Myt1 [26]. Przykładem dodatniego sprzężenia zwrotnego jest również stymulacja procesu

translacji cyklin pod wpływem aktywacji Cdk1 w oocytach *Xenopus*. Istnieją także dowody wskazujące na stymulujące oddziaływanie Cdk1 wobec Plk1, co tworzy kolejny mechanizm potencjalnego sprzężenia zwrotnego [1].

Układ regulacyjny, funkcjonujący przy pomocy systemu pętli sprzężeń zwrotnych, prowadzić może do dwustabilności procesu aktywacji kinazy Cdk1 [7]. Poziom cyklina B stopniowo zwiększa się w trakcie fazy G_2 , osiągając maksimum w mitozie. Synteza coraz większej liczby cząsteczek cykliny B (lub innego bodźca wyzwalaającego mitozę) i stopniowy wzrost ich stężenia może „przełączać” komórkę ze stabilnego stanu interfazowego (z ufosforylowaną na T14 i Y15, nieaktywną kinazą Cdk1, z wyłączoną pod względem czynnościowym kinazą Plx1 i fosfatazą Cdc25C, natomiast aktywnymi kinazami Wee1 i Myt1), w całkowicie odmienny stan mitotyczny (z aktywnymi cząsteczkami: Cdk1, Plx1 i Cdc25C, a nieaktywnymi kinazami Wee1 i Myt1). Osiągnięty tą drogą status „mitotyczny” utrzymywać się może do chwili, zależnej od kompleksu Cdk1-cyklina B, aktywacji APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) – kompleksu promującego anafazę, który wymusi ponowne „przełączenie” fizjologii komórki, doprowadzając ostatecznie do osiągnięcia stanu interfazowego. Dwustabilność aktywacji Cdc2 stanowiłaby jednocześnie gwarancję rozdzielności fazy G_2 i mitozy (pozbawionej elementu *continuum* stanów) i nieodwracalności przejścia $G_2 \rightarrow M$.

Podczas interfazy kompleksy Cdk1-cyklina B1 występują wyłącznie w cytoplazmie bądź to w postaci wolnej, bądź w postaci zasocjowanej z siecią mikrotubul i centrosomami [3, 17]. W późnej profazie większość z nich ulega gwałtownej translokacji do jądra komórkowego, co jest skorelowane w czasie z rozpadem otoczki jądrowej [14]. Część kompleksów Cdk1-cyklina B1 pozostaje, w profazie, na terenie cytoplazmy w formie związanej z dzielącymi się centrosomami [3].

Czy istnieje związek między translokacją kompleksów Cdk1-cyklina B1 do jądra komórkowego, a procesem ich gwałtownej aktywacji, na początku mitozy? Możliwe są dwie, alternatywne odpowiedzi:

- (1) aktywacja Cdk1 następuje w cytoplazmie i jest zjawiskiem całkowicie niezależnym od jądrowego importu tej kinazy;
- (2) aktywacja Cdk1 jest ściśle uzależniona od importu kompleksów Cdk1-cyklina B1 oraz Cdc25C do jądra komórkowego.

Wyjaśnienie tej kwestii wydaje się bardziej złożone: aktywacja Cdk1 jest prawdopodobnie niezależna od importu, ale import może wpływać na kinetykę procesu aktywacji Cdk1 [33].

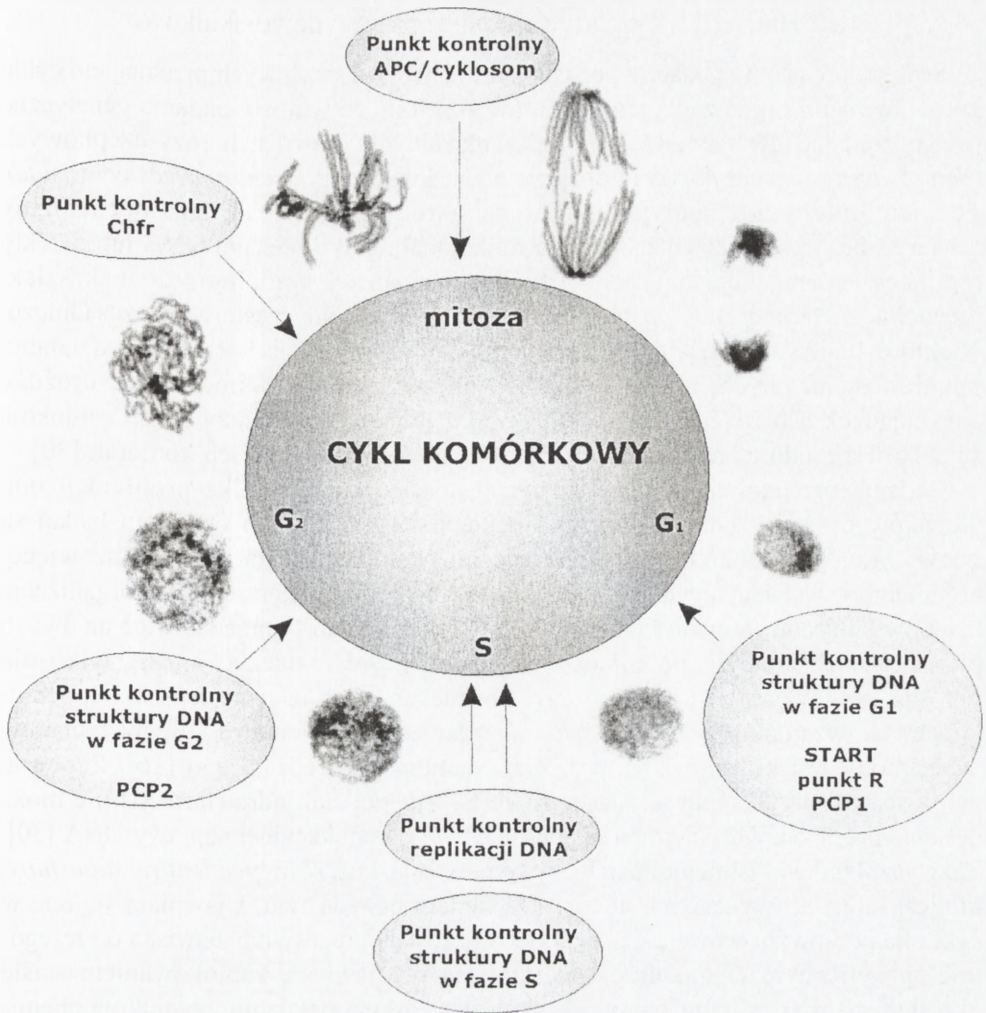
Odległe już w czasie badania nad komórkami zarodków jeźowców i płazów wykazały, że naturalne oscylacje aktywności MPF (przejawiające się zmiennością siły oddziaływania czynnika promującego mitozę) nie ulegają zaburzeniom po enukleacji. Fizjologiczne wahania aktywności Cdk1 obserwuje się także w cytoplazmatycznych, bezjądrowych „ekstraktach *Xenopus*” [13]. W jajowych komórkach rozgwiazd aktywacja kinazy Cdk1 poprzedza jej import do jądra. Niektóre zjawiska cytoplazmatyczne związane z mitozą (np. podział centrosomów), a uzależnione od katalitycznych funkcji kompleksów Cdk1-cyklina B1, następują jeszcze przed migracją

cykliny B1 do profazowego jądra komórki. Wydaje się więc, że – co najmniej w niektórych komórkach – jądrowy import Cdk1 nie jest warunkiem jej aktywacji [10].

Istnieją jednak mocne argumenty teoretyczne sugerujące, że skoordynowany import cykliny B1 i Cdc25C do jądra powinien wspomagać i nasilać proces aktywacji Cdk1. Większości z nich dostarczyły matematyczne analizy Ferrella [6, 7], poświęcone „ultraczułym”, „bramkującym” przełącznikom molekularnym, których organizacja funkcjonalna wykazuje tendencję do preferowania zróżnicowanych reakcji: słabych – w odpowiedzi na działanie słabych stymulatorów, natomiast silnych – w odpowiedzi na stymulatory efektywne, których siła przekracza określony poziom progowy. Takie właśnie cechy mechanizmu przełącznikowego wykazuje system aktywacji Cdk1, który poprzez wbudowane weń pętle sprzężeń zwrotnych, eliminuje wpływ słabych induktorów, chroniąc komórkę przed zbyt wczesną inicjacją mitozy. Działanie tego mechanizmu wydaje się jednak szczególnie istotne w obszarze profazowej, kondensującej chromatyny; aktywacja Cdk1 jest tam silniejsza, a osiągnięty poziom zaktywowania Cdk1 bardziej stabilny. Układ regulacyjny, sterujący transportem cykliny B1 i Cdc25C do jądra komórkowego, stwarzając więc może warunki zwiększające efektywność systemu przełącznikowego, którego podstawowym zadaniem jest gwałtowna aktywacja kinazy mitotycznej. Po pierwsze, import kompleksów Cdk1-cyklina B1 oraz cząsteczek fosfatazy Cdc25C eliminować może całą wewnątrzjądrową aktywność kinazy Wee1, obniżając jej skuteczność jako inhibitora. Efekt ten wzmocniony jest zapewne dodatkowo dominującą w profazie translokacją Wee1 do cytoplazmy. Po drugie, migracja Cdk1 – w kierunku przeciwnym – usuwa tę kinazę z obszaru działania jej inhibitora cytoplazmatycznego, Myt1 [8]. Działanie to wiąże się nie tylko z blokującą aktywność Cdk1 fosforylacją T14 i Y15, ale także z bezpośrednią interakcją C-końcowej domeny Myt1, hamującą także inne funkcje Cdk1, niezbędne w trakcie przejścia komórki z interfazy do mitozy [25].

2. PUNKTY KONTROLNE CYKLU KOMÓRKOWEGO

Między jednym pokoleniem komórek a drugim, podobnie jak między pokoleniami organizmów, istnieje ciągłość. Jej podstawą jest niezwykła wierność przekazu genetycznego – precyzyjne powielanie informacji za sprawą aparatu replikacji DNA oraz rozdzielanie dokładnych, kompletnych replik genomu, dzięki sprawności mechanizmów mitozy. W jakimś sensie, obie te aktywności realizują więc zadania całkowicie przeciwne. Faza S podwaja zawartość DNA, a mitozą dzieli to, co zostało podwojone, między jądra potomne. Być może, pierwotne komórki łączyły oba te procesy w jednym stadium swego życia, zachowując archetypowy ślad tej pradawnej synchronii w zasadach reprodukcji prostych organizmów bakteryjnych. Wzrastająca złożoność genomów stopniowo wymuszała przemienność faz, a silna presja selekcyjna w toku ewolucji, przekształcała zmiany o charakterze oscylacji w mechanizm wykluczający jednoczesność obu stanów. Dlatego też, z reguły, fazowa organizacja cyklu komórkowego u wyższych Eukaryota rozdziela replikację jądrowego DNA i mitozę, doskonale synchronizując je zarazem z procesami objętościowego wzrostu cytoplazmy [5].



RYCINA 2. Lokalizacja wybranych punktów kontrolnych w przebiegu cyklu komórkowego

Funkcję nadzorczą nad integralnością genomu pełnią punkty kontrolne cyklu komórkowego (*cell cycle checkpoints*) (ryc. 2). Ich rola polega na nieustannym monitorowaniu przebiegu procesów metabolicznych, na kształtowaniu między nimi silnych i rygorystycznych zależności. Działanie punktów kontrolnych sprawia, że rozpoczęcie mitozy staje się możliwe dopiero po ukończeniu replikacji i naprawy DNA. U stosunkowo prostych organizmów, takich jak haploidalne drożdże, funkcjonalna sprawność punktów kontrolnych warunkuje przeżycie całego organizmu. W organizmach wielokomórkowych, diploidalnych, w tym także u ludzi, nadzór nad integralnością genomu jest strategią obrony przed rozwojem nowotworów i przekazem chorób o podłożu genetycznym [30].

2.1. Hartwell i Weinert: Zależności przyczynowo-skutkowe

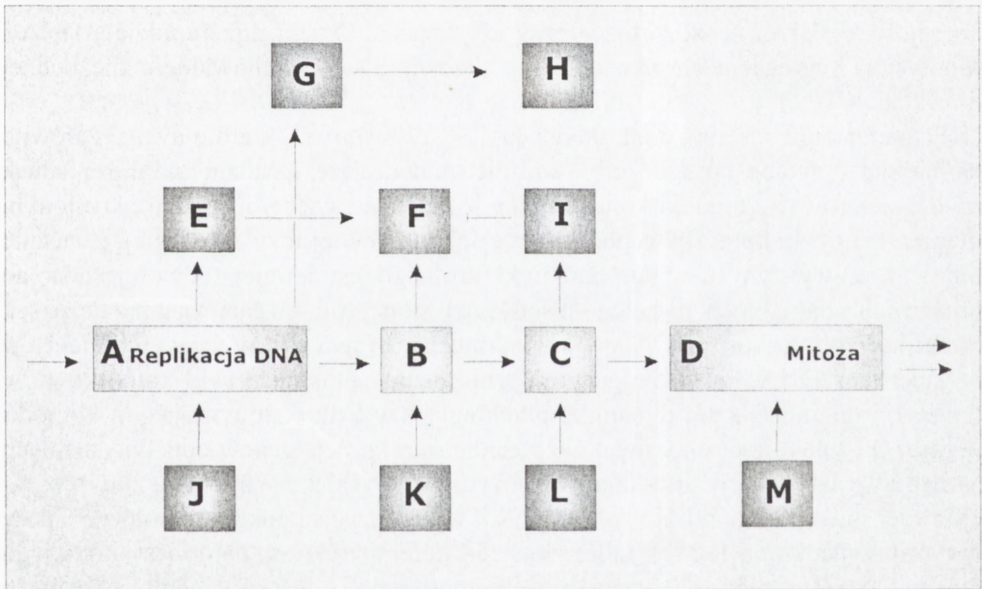
Szczególnie istotny wkład w poznanie mechanizmów rządzących przebiegiem cyklu komórkowego i organizacją jego punktów kontrolnych wniosły badania genetyczne prowadzone na dwóch modelach doświadczalnych: drożdżach rozszczepkowych (*Schizosaccharomyces pombe*) i drożdżach pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*). Pod wieloma względami gatunki te są bardzo podobne, a ich mechanizmy sensoryczne, wykrywające zaburzenia funkcjonalne, uszkodzenia DNA lub defekty replikacyjne, angażują najczęściej białka o znacznej homologii. Jednak szlaki biochemiczne komórek *S. pombe* i *S. cerevisiae* różnią się często wręcz zasadniczo. Niektóre białka drożdży rozszczepkowych, niezbędne dla sprawnego działania punktów kontrolnych, nie mają swoich odpowiedników wśród białek drożdży pączkujących. Co więcej, mechanizmy blokujące inicjację mitozy u obu gatunków są całkowicie odmienne, ponieważ różne są sposoby podziału ich komórek [30].

Badania mechanizmów genetycznych, sterujących dynamiką proliferacji obu gatunków drożdży, a także analizy biochemiczne, w których obiektem badań są oocyty *Xenopus* lub ich cytoplazmatyczne ekstrakty, dostarczają coraz więcej argumentów wskazujących na sekwencyjną, a zarazem hierarchiczną organizację układów kontrolnych cyklu komórkowego. Organizacja ta sytuuje się więc na dwóch płaszczyznach analizy: poziomej i pionowej, które rozłączyć można tylko dla uproszczenia wyjaśnień. Po pierwsze, postrzegana jest jako następstwo uporządkowanych, wzajemnie warunkujących się zdarzeń, gdzie każdy z kolejnych etapów uzależniony jest od pomyślnej realizacji stadium poprzedzającego [16]. Zapewne najprostszym przykładem jest następstwo S→M: podział jądra (faza M) nie może nastąpić przed zakończeniem replikacji (fazy S) i poreplikacyjnej naprawy DNA [30]. Zazwyczaj jednak, istnienie takich „systemów zależności” (*dependent relationships*) nie jest łatwe do wykazania, nie jest też faktem oczywistym. Ujawniają się one w cyklu komórkowym wówczas, gdy zakłócone zostają procesy lub zjawiska o szczególnie specyficznym charakterze, gdy mutacja przejawia się zablokowaniem ściśle określonego zdarzenia, gdy komórki poddane zostaną działaniu czynników chemicznych, zabiegom mikrochirurgicznym lub eksperymentalnie wymuszonemu złączeniu (fuzji). I znów, powrócić można do znanego następstwa S→M: zablokowanie replikacji DNA pod wpływem chemicznych inhibitorów (np. hydroksymocznika lub afidikoliny) w komórkach bakterii, grzybów, bezkręgowców, kręgowców i roślin, blokuje zarazem podział jądra, a w konsekwencji także cytokinezę [16].

Pamiętać należy, że punkt kontrolny cyklu komórkowego jest jednocześnie określonym szlakiem biochemicznym, wyposażonym w elementy sensoryczne – wykrywające zaburzenia strukturalne, elementy przekaźnikowe – transmitujące sygnał o uszkodzeniu lub nieprawidłowej funkcji oraz elementy efektorowe [19]. Pomiędzy odrębnymi procesami punkty kontrolne ustanawiają zależności przyczynowo-skutkowe [16, 27] oraz związki o charakterze sprzężeń zwrotnych [5]. Ich efektywność przejawia się głównie w spowolnieniu lub całkowitym zablokowaniu cyklu komórkowego do momentu pojawienia się sygnałów informujących o zrealizowaniu procesów metabolicznych umożliwiających dalszy, prawidłowy już przebieg kolejnych

etapów interfazy lub mitozy. Końcowymi elementami w łańcuchu zdarzeń indukowanych przez te sygnały są zjawiska wyzwalane aktywnością kompleksów Cdk-cyklina, które są zarówno czynnikami wykonawczymi – „efektorami” punktów kontrolnych, jak i kluczowymi regulatorami zjawisk zachodzących w przejściowych stadiach cyklu komórkowego [5]. Modele opisujące funkcje punktów kontrolnych nie są więc – w zasadzie – niczym innym, jak tylko próbą wyjaśnienia wzajemnych, molekularno-biochemicznych uwarunkowań, sterujących następstwem głównych zjawisk obserwowanych w przebiegu interfazy i mitozy.

Jakie zasady decydują w komórce o ukształtowaniu się takiej, a nie innej sekwencji zdarzeń? Czy uporządkowanie to wynika – po prostu – z istnienia mechanizmów kontrolnych, „wymuszających” określoną kolejność procesów? Nie ulega wątpliwości, że znaczna część tych procesów wiąże się z konstrukcją olbrzymich kompleksów makrocząsteczek, a ich montaż jest swoistym przejawem morfogenezy molekularnej. Uporządkowanie nawet bardzo skomplikowanych serii takich zdarzeń wynikać może z charakterystyki elementów tworzących większą całość, z ich cech własnych (immanentnych), „wewnętrznych” (*intrinsic*), a nie z „zewnętrznych” (*extrinsic*) oddziaływań, w których pośredniczą mechanizmy kontrolne. Hartwell i Weinert [16] określają takie uporządkowanie jako zależność typu „substrat-produkt” (ryc. 3).



RYCINA 3. Hipotetyczne oddziaływania wewnętrzne (*intrinsic*; szlak A→B→C→D) oraz zewnętrzne (*extrinsic*; elementy składowe: E, F, G, H, I, J, K, L, M) w regulacji przejścia S→M. Oddziaływania wewnętrzne tworzą uporządkowanie typu „substrat-produkt”; zależności takie mogą być także elementami szlaków kontrolnych zewnętrznych wobec głównego ciągu zdarzeń A–D (na podstawie tekstu [16], rysunek oryginalny)

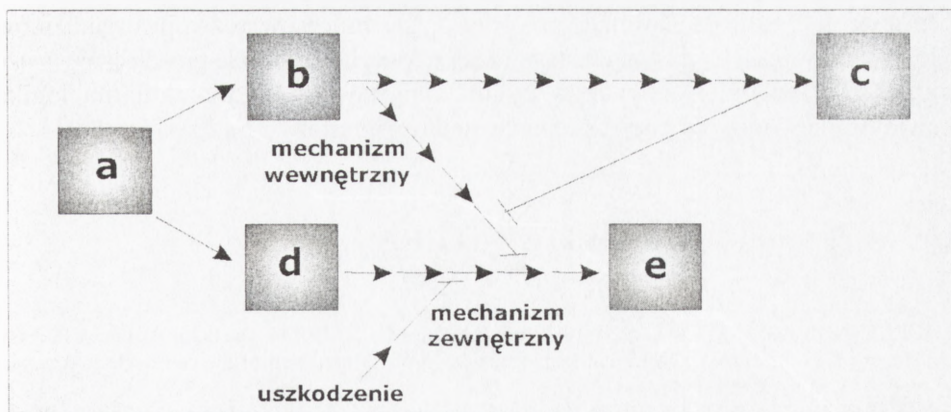
Sekwencje zdarzeń w cyklu komórkowym mogą być nie tylko efektem podporządkowania regule „substrat-produkt”. Jej działanie przejawia się na przykład wtedy, gdy zreplikowane chromosomy pełnią rolę „substratów” mitozy (ryc. 3 A-B-C-D). Procesy kondensacji i separacji chromosomów stają się wówczas „produktami” wcześniejszej replikacji DNA. Jeśli jednak zależność $S \rightarrow M$ jest odpowiedzią na obecność inhibitora mitozy (aktywowanego w komórkach zawierających chromosomy niezreplikowane; ryc. 3 A-E-F-B), to uwarunkowanie nabiera cech typowych dla mechanizmu kontrolnego. Równie skutecznie zależność tego typu wyzwolić może aktywator, pojawiający się w odpowiedzi na sygnał o zakończonej biosyntezie DNA (ryc. 3 A-G-H-I-C). W takim przypadku jednak, odróżnienie przyczynowo-skutkowego związku „substrat-produkt” od reakcji na działanie aktywatora jest szczególnie trudne [16].

2.2. Elledge: Systemy sprzężeń zwrotnych

Analizując organizację złożonych układów regulacyjnych dąży się do poznania ich składników, próbując zarazem uzasadniać istniejące między nimi relacje. W analizach funkcjonalnej organizacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego perspektywę wyznacza następstwo zdarzeń. To sekwencyjność powiązań sprawia, że każda zmiana w łańcuchu procesów metabolicznych „stawia pod znakiem zapytania” powodzenie całości programu. Według Elledge’a [5] punkty kontrolne to – w istocie – biochemiczne systemy, konserwatywne szlaki regulacyjne sterujące kolejnością zdarzeń i nadzorujące czas ich trwania. Dzięki nim replikacja DNA i mitotyczna segregacja chromosomów realizowane są z zachowaniem niezbędnej dokładności.

Semantycznie, termin „punkt kontrolny” – „*checkpoint*”, kieruje uwagę zarówno na miejsce – granicę, jak i funkcję – badanie sprawdzające. Dualizm taki może jednak mylić, sugerować, że punkt kontrolny nie jest niczym więcej niż tylko określonym momentem cyklu komórkowego, lub przejściem z jednej fazy do drugiej. Znacznie bliższa rzeczywistym funkcjom punktu kontrolnego jest definicja odwołująca się do organizacji szlaku biochemicznego o ściśle określonej roli – ustanawianiu zależności. Punkt kontroli uszkodzeń DNA jest więc mechanizmem wykrywającym defekty w cząsteczkach DNA, ale także generującym sygnały blokujące cykl komórkowy w fazie G_1 , ograniczającym dynamikę przebiegu fazy S lub zatrzymującym komórki w fazie G_2 . Punkt kontrolny indukuje ponadto transkrypcję genów odpowiedzialnych za naprawę DNA, jeśli zaś skala uszkodzeń jest zbyt duża – inicjuje szlak programowanej śmierci komórki lub apoptozy. Tak więc, pozycja punktu kontrolnego zależy w tym przypadku od fazy, w której wystąpił defekt struktury, natomiast utrata jego funkcji może, lecz nie musi, przejawiać się bezpośrednimi konsekwencjami na poziomie organizmu [5].

Sekwencja zdarzeń w cyklu komórkowym jest łańcuchem jednokierunkowych przejść – zmian między jednym stanem a drugim. Zakończenie procesów związanych z aktywnością stanu „a” zmienia się w nową aktywność stanu „b”, dostosowaną do zadań tworzących warunki, które umożliwią – z kolei – przejście w kolejny stan



RYCINA 4. Modelowy szlak genetyczny ukazujący mechanizmy wewnętrzne (*intrinsic*) i zewnętrzne (*extrinsic*) punktu kontrolnego wg Elledge'a [5] (schemat zmodyfikowany). Litery oznaczają procesy zachodzące w cyklu komórkowym. Strzałki wskazują na kolejne reakcje aktywujące. Wewnętrzny mechanizm punktu kontrolnego sprawia, że zjawisko „c” realizowane jest przed wydarzeniem „e”. Po zakończeniu procesu „c” wysyłany jest sygnał wyłączający inhibicyjne oddziaływanie związane ze zdarzeniem „b”, co umożliwia – z kolei – ukończenie procesu „e”. Działanie mechanizmu zewnętrznego jest aktywowane po wykryciu uszkodzenia DNA lub błędów w strukturze wrzeciona podziałowego; symbole obrazujące jego funkcjonowanie umiejscowiono arbitralnie podczas przejścia z „d” do „e”, ale mogą funkcjonować także blokując np. przejście z „b” do „c”. Mechanizm zewnętrzny korzystałby wówczas z funkcji mechanizmu wewnętrznego, blokując cykl komórkowy. Mutacje w obrębie którekolwiek ze szlaków – zewnętrznego lub wewnętrznego – prowadzą do defektu punktu kontrolnego

„c”. To typowa zależność „substrat-produkt” z koncepcji Hatwella i Weinerta [16]. Jak wiemy, systemy zależności wynikać mogą także z funkcji dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych. Wydaje się też, że właśnie sprzężenia zwrotne kształtują typowe układy regulacyjne, a ich rola nadzorcza w cyklu komórkowym polega przede wszystkim na kontroli stanu metabolicznego, zanim rozpocznie się kolejne stadium przejściowe (ryc. 4).

Istnieją dwie klasy układów regulacyjnych. Układy wewnętrzne (*intrinsic*), o charakterze konstytutywnym, porządkują zdarzenia immanentnie związane z przebiegiem cyklu komórkowego. Działanie układów zewnętrznych (*extrinsic*) ujawnia się pod wpływem czynników indukujących; są one zaangażowane tylko wówczas, gdy zostaną wykryte uszkodzenia [5]. Układy należące do każdej z tych klas korzystać mogą, po części, z tych samych szlaków biochemicznych. Poznanie ich funkcji jest szczególnie ważne, monitorują bowiem zarówno przebieg procesu replikacji DNA, jak i segregacji chromosomów. Zaburzenia w organizacji tych układów regulacyjnych obniżają potencjał reprodukcyjny organizmów jednokomórkowych, a u wielokomórkowych prowadzić mogą do niekontrolowanej proliferacji i rozwoju raka.

Użycie terminu „punkt kontrolny” jest odniesieniem do określonego podzbioru wewnętrznych i zewnętrznych mechanizmów regulacyjnych, tworzących związki uzależniające procesy późniejsze od realizacji wcześniejszych. Związki te nie są wynikiem „pokrewieństwa” biochemicznego. Chociaż tak sformułowana definicja

może mieć szersze zastosowanie (np. przy opisie procesów rozwoju organizmów wielokomórkowych), jej pierwotne, najbardziej użyteczne znaczenie nieodłącznie wiąże kontrolę zdarzeń przejściowych w cyklu komórkowym z „molekularną logiką przewidywania” oraz promocji kolejnych stadiów interfazy i mitozy [5].

LITERATURA

- [1] ABRIEU A, BRASSAC T, GALAS S, FISHER D, LABBÉ J-C, DORÉE M. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G₂/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 1998; **111**: 1751–1757.
- [2] BACSKAI A, SERAPHIN B, SERRANO L. Positive feedback in eukariotic gene net-works: cell differentiation by graded to binary response conversion. *EMBO J* 2001; **20**: 2528–2535.
- [3] BAILLY E, PINES J, HUNTER T, BORNENS M. Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and the centrosome. *J Cell Sci* 1992; **101**: 529–545.
- [4] DECKERT J. Mechanizmy regulujące cykl komórkowy. W: Regulacja genów cyklu komórkowego roślin. 2000; Wydaw. Nauk. Uniwersytetu w Poznaniu: 22–37.
- [5] ELLEDGE SJ. Cell cycle checkpoint: preventing an identity crisis. *Science* 1996; **274**: 1664–1672.
- [6] FERRELL JE Jr. How regulated protein translocation can produce swich-like responses. *Trends Biochem Sci* 1998; **12**: 461–465.
- [7] FERRELL JE jr. Self-perturbating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Op Chem Biol* 2002; **6**: 140–148.
- [8] FERRELL JE Jr., MACHLEDER EM. The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* 1998; **280**: 895–898.
- [9] FERRELL JE Jr., XIONG W. Bistability in cell signaling: how to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible. *Chaos* 2001; **11**: 227–236.
- [10] FURUNO N, den ELZEN N, PINES J. Human cyclin A is required for mitosis until mid-prophase. *J Cell Biol* 1999; **147**: 295–306.
- [11] GARDNER TS, CANTOR CR, COLLINS JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 2000; **403**: 339–342.
- [12] GEITLER L. Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. *Chromosoma* 1938; **1**: 1–22.
- [13] GOTOH T, OHSUMI K, MATSUI T, TAKISAWA H, KISHIMOTO T. Inactivation of the checkpoint kinase Cds1 is dependent on cyclin B-Cdc2 kinase activation at the meiotic G(2)/M-phase transition in *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 2001; **114**: 3397–3406.
- [14] HAGTING A, JACKMAN M, SIMPSON K, PINES J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 1999; **9**: 680–689.
- [15] HARTWELL LH, HOPFIELD JJ, LEIBLER S, MURRAY AW. From molecular to modular cell biology. *Nature* 1999; **402**: C47–C52.
- [16] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [17] HEMSLEY R, McCUTCHEON S, DOONAN J, LLOYD C. P34(cdc2) kinase is associated with cortical microtubules from higher plant protoplasts. *FEBS Lett* 2001; **508**: 157–161.
- [18] JOHN PCL, MEWS M, MOORE R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma* 2001; **216**: 119–142.
- [19] KHANNA KK, JACKSON SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; **27**: 247–254.
- [20] KIRSCHNER M, GERHART J. Evolvability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8420–8427.
- [21] KUMAGAI A, DUNPHY WG. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 1991; **64**: 903–914.
- [22] MUELLER PR, COLEMAN TR, DUNPHY WG. Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 116–134.

- [23] MUELLER PR, COLEMAN TR, KUMAGAI A, DUNPHY WG. Myt1: A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995; **270**: 86–90.
- [24] NEBREDA AR, FERBY I. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Op Cell Biol* 2000; **12**: 666–675.
- [25] O'FARRELL PH. Triggering the all-or-nothing swich into mitosis. *Trends Cell Biol* 2001; **12**: 512–519.
- [26] PALMER A, GAVIN AC, NEBREDA AR. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J* 1998; **17**: 5037–5047.
- [27] PARDEE AB. Multiple molecular levels of cell cycle regulation. *J Cell Biochem* 1994; **54**: 374–378.
- [28] PINES J, RIEDER CL. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: E3–E6.
- [29] QIAN YW, ERIKSON E, TALEB FE, MALLER JL. The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 1791–1799.
- [30] RUSSELL P. Checkpoint on the road to mitosis. *Trends Biol Sci* 1998; **23**: 399–402.
- [31] SMITS VAJ, MEDEMA RH. Checking out the G₂/M transition. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1519**: 1–12.
- [32] SOLOMON MJ, GLOTZER M, LEE TH, PHILIPPE M, KIRSCHNER MW. Cyclin activation of p34^{cdc2}. *Cell* 1990; **63**: 1013–1024.
- [33] TAKIZAWA CG, MORGAN DO. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 658–665.
- [34] TYSON JJ, CHEN K, NOVAK B. Network dynamics and cell physiology. *Nature* 2001; **2**: 908–916.
- [35] WANG X, TOKUDA H, HIRADE K, KOZAWA O. Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (JNK) plays a part in endothelin-1-induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002; **87**: 417–423.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 14.06.2004 r.

Przyjęto: 28.06.2004 r.

Adres autora: 90-231 Łódź, ul. Pilarńskiego 14,

TRÓJNICIOWY DNA I JEGO ZASTOSOWANIA*

TRIPLE-STRANDED DNA AND ITS APPLICATIONS

Maja KŁOSIŃSKA, Janusz BŁASIAK

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Trójniciowy DNA może powstawać w wyniku specyficznych sekwencyjnie oddziaływań dwuniciowego DNA z jednoniciowymi oligonukleotydami nazywanymi TFO. Istnieje wiele potencjalnych zastosowań strategii indukcji struktur trójniciowych przez te cząsteczki. Umożliwiają one specyficzne blokowanie sekwencyjnie replikacji oraz regulację ekspresji genów przez hamowanie transkrypcji. Szczególnie obiecująca, ze względu na potencjalne możliwości zastosowania w terapii genowej, jest zdolność TFO do wprowadzania mutacji do genomowego DNA oraz indukcji homologicznej rekombinacji. Nim jednak będzie można wykorzystać TFO i ich analogi w praktyce, konieczne jest przeprowadzenie szeregu badań.

Słowa kluczowe: trójniciowy DNA, oligonukleotydy tworzące struktury trójniciowe, peptydowe kwasy nukleinowe.

Summary: Triple-stranded DNA structures can be formed as a result of sequence-specific interactions between double-stranded DNA and single-stranded oligonucleotides called TFOs (triplex forming oligonucleotides). There are many potential uses of DNA triplexes induced by TFOs. They may interfere with transcription and replication. They may also induce mutations and homologous recombination, being a potential tool in gene therapy. There is a need of further research to develop a strategy of using TFOs.

Key words: triple-stranded DNA, triplex forming oligonucleotides, peptide nucleic acids.

1. CHARAKTERYSTYKA TRÓJNICIOWEGO DNA

Trójniciowy DNA został opisany zaledwie cztery lata po ogłoszeniu struktury podwójnej helisy DNA [23]. Trójniciowy DNA może powstawać w obrębie traktów purynowo-pyrimidynowych i składa się z dwuniciowego DNA oraz położonej w jego większym rowku trzeciej nici [25]. Zasady azotowe wchodzące w jej skład tworzą po dwa wiązania Hoogsteena z nicią purynową podwójnej helisy. Ponieważ

*Niniejsza praca została wykonana w ramach badań własnych 505/450 Uniwersytetu Łódzkiego.

pirymidyny mogą, oprócz klasycznych wiązań Watsona-Cricka, tworzyć tylko jedno wiązanie Hoogsteena, nie biorą udziału w wiązaniu trzeciej nici [66]. Trzecia nić może się składać albo z pirymidyn, albo z puryn, gdyż purynowa nić podwójnej helisy wiąże się zarówno z jednym, jak i z drugim rodzajem zasad azotowych. Na tej podstawie można podzielić struktury trójniciowe DNA na typy: Pir • Pur • Pir, gdzie trzecia nić zawiera pirymidyny i Pir • Pur • Pur, w której składa się ona z puryn [66]. W pierwszym przypadku nić pirymidynowa układa się w większym rowku dupletu równoległe do nici purynowej, a jej zasady azotowe tworzą z nią wiązania Hoogsteena. Powstające trójki zasad to T.A:T i C.G:C, a pojedyncza kropka oznacza wiązanie Hoogsteena, dwukropki – wiązanie Watsona-Cricka. W drugim, nić purynowa tworzy odwrotne wiązania Hoogsteena antyrównoległe z nicią purynową dupletu, a trójki zasad to A.A:T i G.G:C [24, 44]. Ponieważ kombinacje nukleotydów w strukturach trójniciowych nie są dowolne, trzecia nić wiąże się z traktem purynowo-pirymidynowym w sposób specyficzny sekwencyjnie [25].

Trójniciowy DNA można klasyfikować również na podstawie pochodzenia trzeciej nici. Może ona stanowić odrębną cząsteczkę (wówczas tworzą się tripleksy międzycząsteczkowe) lub fragment tej samej cząsteczki (tripleksy wewnątrzcząsteczkowe). Zwykle tripleksy wewnątrzcząsteczkowe powstają w obrębie sekwencji zawierających trakty pirymidynowo-purynowe z symetrią zwierciadlaną, czyli taką, która odczytywana w kierunku zarówno 5', jak i 3' jest taka sama. Sekwencje takie tworzą tripleksy w wyniku zagięcia DNA w połowie sekwencji zwierciadlanej, jego rozplecenia i wniknięcia jednej z nici (pełniącej funkcję trzeciej nici) w większy rowek podwójnej helisy, nić komplementarna do niej pozostaje niesparowana [40]. W tworzeniu struktury trójniciowej może uczestniczyć zarówno purynowa, jak i pirymidynowa nić traktu. Najpierw odkryto tripleks Pir • Pur • Pir, powstający przy podwyższonym stężeniu H⁺ ze względu na konieczność protonacji cytozyny i z tego względu nazwany H-DNA [46]. Utworzenie Pir • Pur • Pur nie wymaga kwaśnego środowiska, lecz obecności jonów wielowartościowych, dla odróżnienia od H-DNA formę tą nazwano H*-DNA [5]. Tripleksy międzycząsteczkowe natomiast tworzą się, gdy jednoniciowy oligonukleotyd o odpowiedniej sekwencji, będący odrębną cząsteczką, wiąże się z purynowo-pirymidynowym dupleksem DNA [66].

2. ZASTOSOWANIE TRIPLEKSÓW DNA

2.1. Ogólna charakterystyka TFO i PNA

Trójniciowy DNA może powstawać w wyniku oddziaływania dupletu z oligonukleotydami nazywanymi TFO (*triplex forming oligonucleotide*) [39]. Te 10–30-nukleotydowe cząsteczki specyficznie wiążą się przez większy rowek z dwuniciowym DNA w obrębie traktów polipurynowo-polipirymidynowych. Trakty te są często spotykane w regionach regulacyjnych genów [44]. Ponieważ TFO tworzą stabilne struktury trójniciowe, potencjalnie możliwe jest opracowanie metod

wykorzystania ich do specyficznego regulowania aktywności wybranych genów, umożliwiając blokowanie ich ekspresji oraz modyfikację sekwencji przez miejscowo specyficzną mutagenezę lub indukcję rekombinacji [38, 51, 54, 74]. Niestety, chemiczne właściwości tych cząsteczek i warunki panujące w żywych komórkach znacznie ograniczają możliwości stosowania ich *in vivo*. TFO mają ujemny ładunek, wobec czego z trudem wiążą się z ujemnie naładowanym dupleksem DNA przy fizjologicznym stężeniu Mg^{2+} [7, 60]. TFO składające się z pirymidyn wiążą się z sekwencjami docelowymi głównie przy pH niższym (< 4,5) niż komórkowe, gdyż do utworzenia jednego z wiązań Hoogsteena konieczna jest protonacja cytozyny [3]. Z kolei w obrębie nici purynowych bogatych w guaninę mogą tworzyć się kwartety przy fizjologicznych stężeniach K^+ , co wyklucza oddziaływanie z sekwencją docelową i powstawanie struktury trójniciowej [2]. Jeśli koniec 3' TFO nie jest odpowiednio zmodyfikowany, nukleazy rozpoznające jednoniciowy DNA degradują cząsteczkę, nim dotrze do sekwencji docelowej [1]. Ponadto, wydajność wiązania TFO z DNA chromosomowym jest ograniczona ze względu na obecność nukleosomów. Sekwencje DNA związane z histonami nie są dla TFO dostępne [8]. Stwierdzono również hamowanie powstawania nukleosomów w obrębie fragmentów DNA związanych z TFO, co świadczy o współzawodnictwie między nimi a białkami [17,79]. Struktura chromatyny zmienia się w trakcie transkrypcji, więc łatwiej dostępne dla TFO są sekwencje aktywnie transkrybowane [48].

Przynajmniej część z trudności w specyficznym indukowaniu trójniciowych struktur DNA *in vivo* można pokonać poprzez stosowanie modyfikowanych oligonukleotydów. Bardzo obiecujące jako czynnik umożliwiający specyficzne sekwencyjne wiązanie DNA oraz jako leki modyfikujące ekspresję genów są peptydowe analogi kwasów nukleinowych (*peptide nucleic acid*, PNA). Są one odpowiednikami oligonukleotydów zawierającymi zasady azotowe występujące w DNA, jednak zamiast ujemnie naładowanego fosfocukrowego mają neutralny szkielet poliamidowy (białkopodobny) [29, 56]. PNA tworzą z DNA nietypowe struktury trójniciowe – dwie homopirymidynowe cząsteczki PNA powodują dyslokację nici pirymidynowej dupleksu DNA i wiążą się z jego nicią purynową. Tak powstałe struktury cechują się dużą stabilnością [56]. PNA nie tylko tworzą trwalsze struktury trójniciowe z DNA, są one również o wiele stabilniejsze *in vivo* niż zwykłe oligonukleotydy, co zwiększa szansę na ich zastosowanie jako leki [25].

2.2. Zastosowania tripleksów DNA *in vivo*

Specyficzność sekwencyjną wiązania TFO i ich analogów z DNA oraz stabilność powstających w ten sposób struktur trójniciowych umożliwia ich wykorzystanie na wiele sposobów. Strategię indukcji tripleksów DNA można stosować w regulacji ekspresji wybranych genów przez przyłączenie TFO do ich sekwencji regulacyjnych, co blokuje inicjację transkrypcji, lub do innego odcinka w obrębie danego *locus*, co utrudnia elongację [43]. Strategia ta okazała się skuteczna w hamowaniu replikacji DNA [14]. Obecnie wydaje się, że wydajniejsze metody regulacji ekspresji genów oparte są na niedawno opisanym zjawisku wyciszania RNA (RNAi – *RNA*

interference) [72]. Oligonukleotydy tworzące z DNA struktury trójniciowe można jednak, w przeciwieństwie do RNAi, wykorzystać do wprowadzania dziedzicznych zmian w sekwencji zasad azotowych. Mogą one służyć do miejscowo specyficznej chemicznej modyfikacji wybranych genów, a nawet do indukowania homologicznej rekombinacji DNA [43]. Ta obiecująca metoda ma wiele potencjalnych zastosowań wymagających dalszych badań.

2.2.1. Modyfikacje chemiczne DNA

Specyficzność sekwencyjna TFO i PNA umożliwia ich wykorzystanie w ukierunkowanej mutageniezie. Wybrane fragmenty DNA w wyniku ich działania ulegają nieodwracalnym zmianom, wobec czego TFO uznawane są za potencjalne leki, również antywirusowe [4]. Istnieją szanse wykorzystania ich w terapii genowej niektórych chorób. Do wprowadzania modyfikacji sekwencji DNA stosuje się najczęściej TFO z przyłączonymi cząsteczkami mutagennymi, TFO zapewniają specyficzność sekwencyjną działania mutagenów. Jedną z częściej stosowanych cząsteczek mutagennych jest psoralen, fotouczulacz, który po naświetleniu UV o długości fali 365 nm wprowadza kowalencyjne wiązania krzyżowe do sekwencji docelowej, wysoce mutagenne w komórkach eukariontów [32, 37, 67, 74].

Skuteczność metody wykorzystującej TFO połączone z psoralenem stwierdzono w doświadczeniach *in vitro*, gdzie wprowadzano przy ich pomocy mutacje w obrębie genu reporterowego *supF* w wektorze SV40 [37]. Potwierdzono również jej skuteczność *in vivo* [74]. Do komórek ssaczy wprowadzano wektor SV40 zawierający zmodyfikowany gen *supF* (*supFG1*, z dołączoną sekwencją polipurynową), po czym transfekowano je specyficznymi TFO połączonymi z psoralenem. Stwierdzone mutacje niewątpliwie związane były z tworzeniem się trójniciowych struktur DNA, gdyż modyfikacje sekwencji docelowej znosiły ich powstawanie [4, 74]. Ponadto obserwowane zmiany w DNA odpowiadały spektrum mutacyjnemu psoralenu [4]. Mutacje powstawały z częstością 1–2%, niższą niż obserwowana *in vitro* (6–7%), przy czym były to głównie transwersje A→T i T→A [74]. Podobne doświadczenia wykonano na komórkach drożdżowych, gdzie modyfikacja genu reporterowego zachodziła z jeszcze mniejszą wydajnością [4]. Niższa częstość mutacji *in vivo* związana jest z faktem konieczności pokonania przez TFO szeregu barier, między innymi muszą one zostać pobrane przez komórki i przetransportowane do jądra komórkowego, ponadto warunki tam panujące nie są optymalne dla ich wiązania z sekwencją docelową.

Niska częstość mutacji indukowanych przez TFO połączone z psoralenem jest związana również z działaniem komórkowych systemów naprawy DNA. W komórkach ssaków addukty psoralenu są usuwane przez wycinanie nukleotydów (NER) [64]. Zmiany wprowadzane do DNA przez krótkie TFO związane z psoralenem są stosunkowo efektywnie naprawiane, natomiast TFO powyżej 30 nukleotydów przekraczają długością rozmiar fragmentu DNA wycinanego przez NER, blokując naprawę uszkodzeń wprowadzanych przez psoralen [73].

Mimo że stwierdzono skuteczność miejscowo specyficznej mutagenezy z udziałem TFO związanych z psoralenem, jej wykorzystanie u organizmów wielokomórkowych wydaje się mało prawdopodobne. Trakty homopurynowo-homopirimidynowe o długości powyżej 30 nukleotydów nie są tak powszechne jak krótsze odcinki, co zmniejsza ilość potencjalnych sekwencji docelowych. Ponadto, metoda ta wymaga aktywacji psoralenu światłem UV, co nie jest możliwe *in vivo* u wielokomórkowców.

By zwiększyć częstość mutacji i ograniczyć efektywność naprawy przy zastosowaniu krótszych cząsteczek TFO, należałoby wprowadzić do sekwencji docelowej określone uszkodzenia, takie jak pęknięcia obydwu nici DNA, będące jednym ze skutków ekspozycji na promieniowanie jonizujące [78]. Pęknięciom tym towarzyszą modyfikacje i/lub utrata zasad azotowych w sąsiedztwie końców przerwanych nici. Efekt działania promieniowania jonizującego można uzyskać stosując radionuklidy o odpowiednim typie rozpadu umieszczone w pobliżu DNA. TFO znakowane radionuklidem ^{125}I powodują *in vitro* powstawanie dwuniciowych pęknięć DNA w obrębie sekwencji docelowej z dużą efektywnością [53, 58]. Pęknięcia te okazały się wysoce mutagenne w ludzkich fibroblastach, przy czym częstość mutacji była wielokrotnie większa niż uzyskana dla TFO związanych z psoralenem. Niestety, mimo tak obiecujących wyników długi czas połowicznego rozpadu ^{125}I oraz odbiegające od fizjologicznych warunki doświadczeń wykluczają zastosowanie tej metody *in vivo*. Opracowanie zmodyfikowanych oligonukleotydów stabilizujących strukturę tripleksu *in vivo* w połączeniu z zastosowaniem radionuklidów o krótszym czasie półtrwania być może umożliwi wykorzystanie jej w przyszłości.

Miejscowo specyficzna mutageneza jest możliwa także, gdy TFO nie są związane z cząsteczką mutagenu. Same oligonukleotydy również przyczyniają się do wzrostu częstości mutacji w sekwencji docelowej. Prawdopodobnie przyczyną tego zjawiska jest fakt rozpoznawania przez system naprawy NER struktur trójniciowych i uznawania ich za uszkodzenia DNA [65]. Ważną rolę odgrywa w NER białko RPA (*replication protein A*), biorące udział w naprawie, replikacji i rekombinacji DNA [81]. Rozpoznaje ono struktury trójniciowe jako zniekształcenia helisy i wiąże się z nimi. Razem z XPA (*xeroderma pigmentosum complementation group A*) tworzą kompleks rozpoznający uszkodzenia DNA w szlaku naprawy NER. XPA-RPA prawdopodobnie pomaga w rekrutacji innych elementów tego szlaku, co prowadzi do usunięcia tripleksu i w przypadku błędów naprawy do powstania mutacji [70].

Wzrost częstości mutacji wybranej sekwencji po wprowadzeniu niepołączonych z mutagenem TFO zaobserwowano między innymi w trakcie badań na komórkach ssaków. Wykorzystano w nich wektor SV40 zawierający gen reporterowy *supFG1*, który wprowadzono do tych komórek [75]. Związek indukcji mutacji i systemu naprawy NER podkreśla fakt braku wzrostu ich częstości w komórkach linii defektywnych pod względem XPA bądź CSB, białka biorącego udział w naprawie DNA sprzężonej z transkrypcją [75].

Skuteczność stosowania TFO niezwiązanych z innymi cząsteczkami w mutagenezie stwierdzono w komórkach somatycznych dorosłych myszy. Zwierzęta miały w chromosomach zintegrowaną kopię genu reporterowego *supFG1*, zawierającą

sekwencję docelową dla TFO. TFO natomiast składały się z 30 nukleotydów (czyli były na tyle długie, by utrudniać NER) oraz zawierały modyfikację (grupę propanolaminową po stronie 3') chroniącą je przed degradacją przez egzonukleazy. Oligonukleotydy te wstrzykiwano myszom dootrzewnowo przez 5 dni, po czym po upływie kolejnych 10 dni zbadano ich tkanki na obecność mutacji [71]. Wykryto pięciokrotny wzrost częstości mutacji w genie reporterowym w tkankach myszy. Ponieważ udało się w sposób specyficzny wprowadzić zmiany w sekwencji DNA w komórkach dorosłych zwierząt, istnieje nadzieja na wykorzystanie tej metody w terapii genowej u ludzi.

2.2.2. Hamowanie transkrypcji i replikacji

TFO i ich analogi nie tylko stymulują systemy naprawy, mogą również zaburzać transkrypcję i replikację. Hamowanie transkrypcji jest skuteczniejsze wówczas, gdy sekwencje docelowe znajdują się w regionach regulatorowych danego genu [43]. Jest to związane z zablokowaniem wiązania białek transkrypcyjnych do sekwencji wchodzących w skład struktury trójniciowej [50, 52, 57]. TFO mogą zapobiegać tworzeniu się aktywnego kompleksu inicjacyjnego, co stwierdzono w trakcie badań z wykorzystaniem promotora ludzkiego genu *c-myc* oraz promotora genu kodującego metalotioneinę, w obrębie którego oligonukleotyd homopirymidynowy, po związaniu się ze swą sekwencją docelową, blokował przyłączenie się czynnika transkrypcyjnego Sp1, znacznie zmniejszając efektywność inicjacji transkrypcji [6, 9, 49, 50]. Badania *in vivo* potwierdziły te wyniki [33, 42].

Zatrzymanie kompleksu elongacyjnego poprzez zastosowanie TFO, dla których sekwencja docelowa leżałaby poza obrębem promotora, jest o wiele trudniejsze niż blokowanie inicjacji transkrypcji. Naturalne oligonukleotydy prawdopodobnie nie tworzą na tyle stabilnych tripleksów, by uniemożliwić dalszą elongację transkryptu [19]. Zahamowanie elongacji jest jednak możliwe dzięki wykorzystaniu analogów oligonukleotydów mających szkielet zawierający połączenia N3'-P5' fosforamidowe, uznanych za najskuteczniejsze inhibitory syntezy RNA *in vitro*, bądź PNA [26]. Skuteczność ich działania stwierdzono zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [16, 19, 20, 27]. Transkrypcyjna elongacja ulega zahamowaniu poprzez mechaniczne zatrzymanie polimerazy, dla której struktura trójniciowa stanowi zawadę przestrzenną. Zmodyfikowane oligonukleotydy mogą w ten sposób hamować polimerazę RNA II i III [13, 30, 47, 82].

TFO i PNA mogą przyczyniać się nie tylko do hamowania transkrypcji, ale również do zwiększania ekspresji genów. Mogą one współzawodniczyć z białkami represorowymi transkrypcji o związane z sekwencją docelową. Przyłączenie do niej TFO lub PNA blokuje wiązanie się represora i umożliwia ekspresję genu [55]. Ponadto, transkrypcję stymulować może przyłączenie PNA w obrębie sekwencji promotorowej genu, gdyż tworząc z DNA strukturę trójniciową powoduje on dyslokację jednej z nici, udostępniając ją białkom transkrypcyjnym. Jeśli nicią tą jest nić matrycowa, to następuje stymulacja ekspresji genu [76].

Niektóre mechanizmy hamowania transkrypcji poprzez tworzenie struktur trójniciowych są przedstawione na rycinie 1.

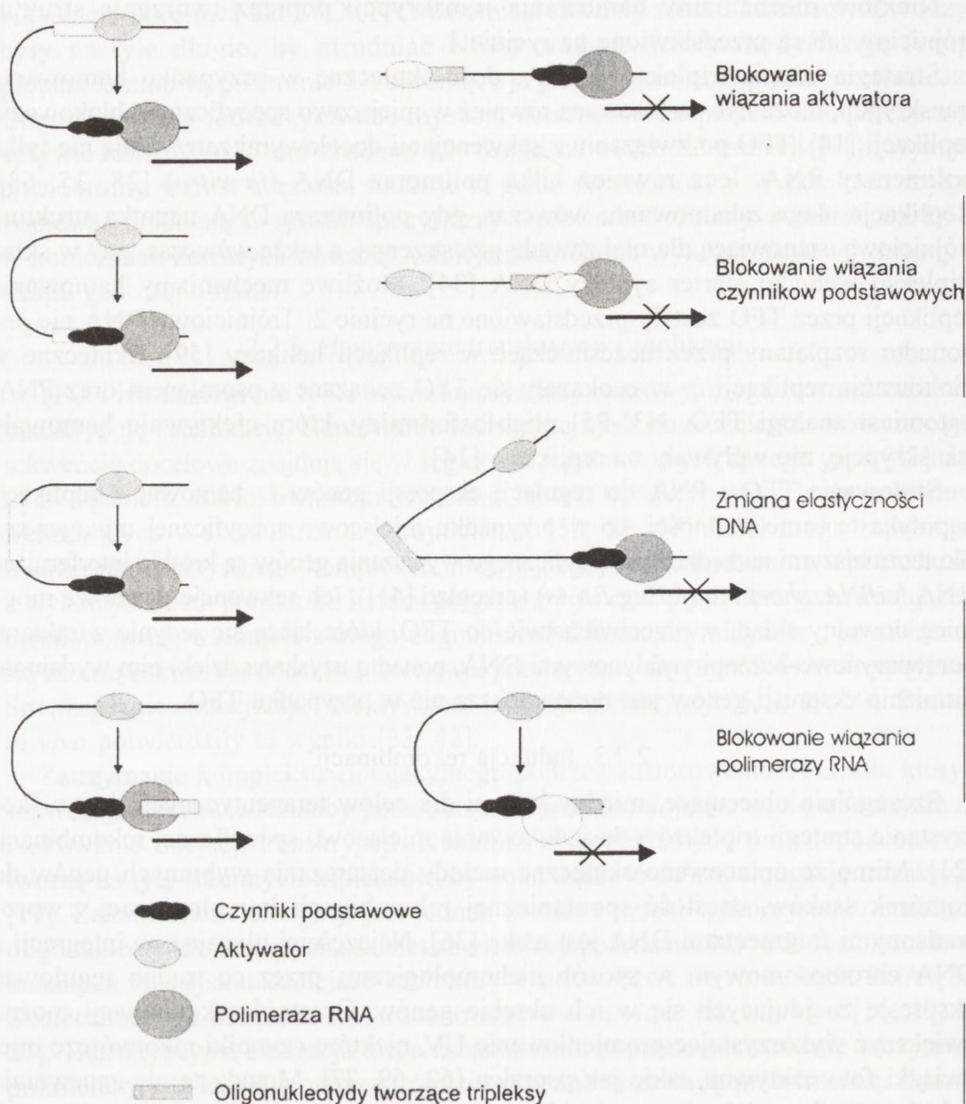
Strategia użycia tripleksów DNA, dość skuteczna w przypadku hamowania transkrypcji, może być zastosowana również w miejscowo specyficznym blokowaniu replikacji [14]. TFO po związaniu z sekwencjami docelowymi zatrzymują nie tylko polimerazy RNA, lecz również kilka polimeraz DNA (*in vitro*) [28, 35, 63]. Replikacja ulega zahamowaniu wówczas, gdy polimeraza DNA napotka strukturę trójniciową, stanowiącą dla niej zawadę przestrzenną, a także wówczas, gdy w skład tripleksu wchodzi starter syntezy DNA [34]. Możliwe mechanizmy hamowania replikacji przez TFO zostały przedstawione na rycinie 2. Trójniciowy DNA nie jest ponadto rozplataný przez uczestniczące w replikacji helikazy [59]. Skuteczne w blokowaniu replikacji *in vivo* okazały się TFO związane z psoralenem oraz PNA, natomiast analogi TFO, N3'-P5' oligofosforamidy, które efektywnie hamowały transkrypcję, nie wpływały na replikację [14].

Stosowanie TFO i PNA do regulacji ekspresji genów i hamowania replikacji napotyka te same trudności, co w przypadku miejscowo specyficznego mutagenyzy. Skuteczniejszymi narzędziami specyficznego wyciszania genów są krótkie interferujące RNA (*siRNA*, *short interfering RNAs*) (przegląd [41]). Ich sekwencje docelowe mogą mieć dowolny skład, w przeciwieństwie do TFO, które łączą się jedynie z traktami homopurynowo-homopirymidynowymi DNA, ponadto uzyskana dzięki nim wydajność tłumienia ekspresji genów jest dużo większa niż w przypadku TFO.

2.2.3. Indukcja rekombinacji

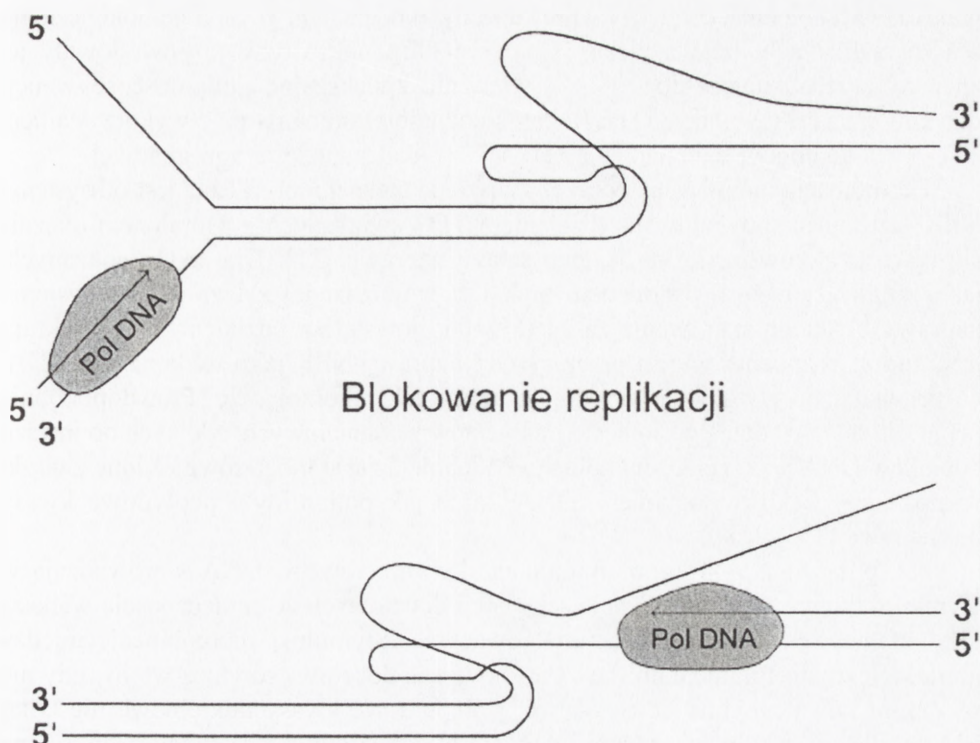
Szczególnie obiecujące, między innymi dla celów terapeutycznych, jest wykorzystanie strategii tripleksów do indukowania miejscowo specyficznego rekombinacji [21]. Mimo że opracowano skuteczne metody dostarczania wybranych genów do komórek ssaków, częstość spontanicznej rekombinacji homologicznej z wprowadzonymi fragmentami DNA jest niska [36]. Najczęściej ulegają one integracji z DNA chromosomowym w sposób niehomologiczny, przez co trudno regulować ekspresję znajdujących się w ich obrębie genów. Częstość rekombinacji można zwiększyć wykorzystując promieniowanie UV, niektóre czynniki rakotwórcze oraz związki fotoreaktywne, takie jak psoralen [62, 69, 77]. Metody te nie zapewniają jednak specyficzności sekwencyjnej koniecznej w terapii genowej, a większość z nich nie może być stosowana w organizmach. Aby umożliwić stosowanie terapii genowej oraz innych metod wykorzystujących rekombinację homologiczną w celu wymiany lub modyfikacji genów w praktyce, konieczne jest opracowanie metod zwiększenia częstości i specyficzności jej zachodzenia.

TFO wiążą się z DNA w sposób specyficzny sekwencyjnie, stymulują systemy naprawy oraz przyczyniają się do wzrostu częstości rekombinacji, stanowią więc potencjalne narzędzie jej specyficznego indukowania. Stwierdzono między innymi skuteczność TFO połączonych z czynnikami trawiącymi DNA, które poprzez wprowadzanie dwuniciowych pęknięć stymulowały rekombinację [83]. TFO, związane z innymi cząsteczkami, przykładowo psoralenem oraz niezwiązane, również zdolne są



RYCINA 1. Hamowanie transkrypcji przez struktury trójniciowe. Wiązanie TFO w obszarze promotorowym może hamować wiązanie aktywatora, podstawowych czynników transkrypcyjnych, w tym polimerazy RNA, lub zaburzać elastyczność DNA, prowadząc do zmiany oddziaływania pomiędzy aktywatorem a pozostałymi składnikami kompleksu transkrypcyjnego. Symbole puste oznaczają miejsca niezwiązane, symbole wypełnione – miejsca zajęte (związane) (na podstawie [84], zmodyfikowano)

do indukcji tego procesu. Utworzona z ich udziałem struktura trójniciowa może powodować powstanie struktur zawierających pęknięte nici skłonne do rekombinacji, co potwierdzono doświadczalnie [21]. Wykorzystano w tym celu wektor skonstruowany na podstawie genomu wirusa SV40, zawierający dwie zmutowane kopie genu reporterowego *supF*, pomiędzy którymi znajdowała się sekwencja docelowa dla TFO.



RYCINA 2. Tworzenie wewnątrzcząsteczkowego tripleksu w obszarze DNA podlegającym replikacji może hamować ten proces. Widelki replikacyjne mogą osiągać tripleks z dwóch kierunków – z jednego polimeraza DNA napotyka wpierw pętlę jednoniciową (dół) i może przemieścić trzecią nić ze struktury tripleksu lub zostanie przez tę strukturę zatrzymana. Gdy polimeraza DNA zbliża się do tripleksu z kierunku przeciwnego (górze), napotyka strukturę, w której trzecia nić jest opleciona wokół dupletu Watsona-Cricka (na podstawie SINDEN RR, *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, 1994, zmodyfikowano)

Ponieważ miejsca mutacji w obu kopiach genu były różne, rekombinacja pomiędzy nimi mogła prowadzić do powstania funkcjonalnego genu reporterowego. Wykorzystanie oligonukleotydów o wysokim powinowactwie indukuje rekombinację homologiczną z częstością pięciokrotnie wyższą niż częstość zachodzenia procesu spontanicznie [21]. Podobne wyniki uzyskano również wtedy, gdy sekwencje docelowe TFO i powtórzenia genu reporterowego położone były w obrębie DNA chromosomalnego [45].

TFO i ich pochodne stymulują rekombinację nie tylko w obrębie tej samej cząsteczki DNA, lecz również między różnymi cząsteczkami [11]. TFO połączone z krótkimi fragmentami dwuniciowego DNA, homologicznymi do sekwencji docelowej, ułatwiają rekombinację między nimi a tą sekwencją, prawdopodobnie przez stymulację jej naprawy w wyniku utworzenia struktury trójniciowej. Zjawisko to obserwowano zarówno wtedy, gdy TFO i homologiczne krótkie odcinki DNA były

ze sobą związane, jak i wówczas, gdy stanowiły odrębne cząsteczki. W przypadku braku TFO rekombinacja między wprowadzonymi odcinkami DNA a homologicznymi sekwencjami zachodziła z niską częstością. Oligonukleotydy te powodowały jej znaczny wzrost, nawet do 0,1–1%, wyraźnie zwiększając podatność sekwencji docelowej na rekombinację [11]. Rekombinacja intermolekularna z wykorzystaniem TFO i ich analogów daje nadzieję na większą skuteczność terapii genowej.

Rekombinacja indukowana poprzez związanie trzeciej nici zależna jest od systemu NER, natomiast spowodowana działaniem TFO związanych z psoralenem okazała się tylko częściowo zależna od tego szlaku naprawy [21]. Dla TFO związanych, jak i niezwiązanych z psoralenem brak jest natomiast jej zależności od systemu naprawy błędnego sparowania zasad (MMR). Powstałe z udziałem TFO struktury trójniciowe rozpoznawane są przez system naprawy NER jako uszkodzenie DNA, co prowadzi do utworzenia struktur promujących rekombinację. Prawdopodobnie pęknięcia nici powodują odsłonięcie fragmentów jednoniciowych, zdolnych do inwazji odcinków DNA wykazujące homologię. Podobnie działać mogą również inne związki wiążące się niekowalencyjnie z DNA, takie jak poliamidy i peptydowe kwasy nukleinowe [15, 22, 80].

PNA połączone z krótkimi fragmentami dwuniciowego DNA wprowadzają w wyniku rekombinacji modyfikacje sekwencji docelowych ze skutecznością większą niż TFO, nawet te o wysokim powinowactwie. Stymulują rekombinację między homologicznymi fragmentami DNA a sekwencją docelową również wtedy, gdy nie są z nimi kowalencyjnie połączone [61]. Peptydowe kwasy nukleinowe nie tylko łatwiej wiążą się z dwuniciowym DNA niż oligonukleotydy, są również odporne na nukleazy i proteazy, co daje im większą stabilność w komórkach [12]. Poważnym utrudnieniem wykorzystania tych cząsteczek jest fakt niskiej wydajności ich transportu do jądra komórkowego [31]. Problem ten można jednak rozwiązać przez połączenie PNA z cząsteczką stanowiącą sygnał lokalizacji jądrowej. Stosując tę metodę uzyskano obniżenie ekspresji onkogenu *c-myc* w komórkach linii wykazujących jego nadekspresję [10].

3. PODSUMOWANIE

Nim będzie możliwe wykorzystanie TFO i PNA w medycynie, konieczne jest rozwiązanie szeregu problemów, szczególnie skutecznego transportu do komórek w organizmach oraz zwiększenia ilości potencjalnych sekwencji docelowych. Jako leki, TFO i PNA mogą służyć przede wszystkim w terapii genowej, głównie chorób, z których wyleczenie umożliwia korekta niewielkiej części komórek pacjenta, np. niektórych chorób metabolicznych, schorzeń wątroby. Dają one również nadzieję na opracowanie skutecznych leków antywirusowych. Metody oparte na TFO i PNA, chociaż bardzo obiecujące, wymagają dalszych badań.

TFO i PNA stanowią obiecujące narzędzie dla miejscowo specyficznej modyfikacji DNA. Są one ważnym narzędziem poznawczym oraz dają nadzieję na opracowanie skutecznych leków. Mają jednak wiele poważnych ograniczeń, szczególnie w stosowaniu *in vivo*. TFO i PNA wiążą się wybiórczo z szlakami (traktami) homopurynowo-homopirymidynowymi, co znacznie ogranicza liczbę potencjalnych sekwencji docelowych. Ponadto stosowanie ich może mieć nieprzewidziane efekty uboczne, na przykład wiadomo, że jednoniciowe kwasy nukleinowe zdolne są do wiązania w sposób specyficzny z białkami regulującymi ekspresję genów [18]. Kolejnym ograniczeniem jest fakt, że w warunkach fizjologicznych TFO słabo wiążą się z sekwencją docelową. Problem ten częściowo rozwiązano przez stosowanie oligonukleotydów o dużym powinowactwie do sekwencji docelowych oraz PNA. Ponadto konieczne jest wprowadzenie takich modyfikacji TFO, które umożliwiłyby zwiększenie ich pobierania przez komórki i oporności na działanie komórkowych nukleaz oraz wzrost stabilności powstałej z ich udziałem struktury trójniciowej. Stosowanie tripleksów ograniczone jest również stosunkowo niską efektywnością wprowadzania zmian do badanych sekwencji, szczególnie *in vivo*, między innymi ze względu na obecność nukleosomów. Problematyczne może się okazać dostarczenie TFO do komórek docelowych, przy czym najdogodniejszym sposobem transportu oligonukleotydów wydają się obecnie nośniki liposomowe [68].

Można rozważać także szereg innych zastosowań trójniciowego DNA zarówno podstawowych, jak i mających znaczenie diagnostyczne i terapeutyczne. Prace badawcze wykonane w ciągu ostatnich 15 lat doprowadziły do stworzenia wielu TFO i PNA o specyficznym zastosowaniu (przegląd w [84]). Co więcej, wprowadza się kolejne modyfikacje do struktur już istniejących, co pozwala na rozszerzenie spektrum ich zastosowania. W świetle ciągłego napływu informacji w wyniku realizacji projektu sekwencjonowania genomu człowieka, należy się liczyć ze zwiększonymi oczekiwaniami na syntezę i zastosowanie związków mogących tworzyć struktury trójniciowe.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują dr. Tomaszowi Popławskiemu za pomoc w wykonaniu rycin.

LITERATURA

- [1] AGRAWAL S, TEMSAMANI J, TANG JY. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxy-nucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7595–7599.
- [2] ARIMONDO PB, GARESTIER T, HELENE C, SUN JS. Detection of competing DNA structures by thermal gradient gel electrophoresis: from self-association to triple helix formation by (G, A)-containing oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: E15.
- [3] ASENSIO JL, LANE AN, DHESI J, BERGQVIST S, BROWN T. The contribution of cytosine protonation to the stability of parallel DNA triple helices. *J Mol Biol* 1998; **275**: 811–822.
- [4] BARRE F, AIT-SI-ALI S, GIOVANNANGELI C, LUIS R, ROBIN P, PRITCHARD L, HELENE C, HARREL-BELLAN A. Unambiguous demonstration of triple-helix-directed gene modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3084–3088.

- [5] BERNUES J, BELTRAN R, CASASNOVAS JM, AZORIN F. Structural polymorphism of homopurine-homopyrimidine sequences: the secondary DNA structure adopted by a d(GA.CT)₂₂ sequence in the presence of zinc ions. *EMBO J* 1989; **8**: 2087–2094.
- [6] BIANCHI N, RUTIGLIANO C, PASSADORE M, TOMASSETTI M, PIPPO L, MISCHIATI C, FERIOOTTO G, GAMBARI R. Targeting of the HIV-1 long terminal repeat with chromomycin potentiates the inhibitory effects of a triplex-forming oligonucleotide on Sp1-DNA interactions and *in vitro* transcription. *Biochem J* 1997; **326**: 919–927.
- [7] BLUME SW, LEBOWITZ J, ZACHARIAS W, GUARCELLO V, MAYFIELD CA, EBBINGHAUS SW, BATES P, JONES DE Jr, TRENT J, VIGNESWARAN N, MILLER DM. The integral divalent cation within the intermolecular purine*purine.pyrimidine structure: a variable determinant of the potential for and characteristics of the triple helical association. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 695–702.
- [8] BROWN PM, FOX KR. Nucleosome core particles inhibit DNA triple helix formation. *Biochem J* 1996; **319**: 607–611.
- [9] COONEY M, CZERNUSZEWICZ G, POSTEL EH, FLINT SJ, HOGAN ME. Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human *c-myc* gene *in vitro*. *Science* 1988; **241**: 456–459.
- [10] CUTRONA G, CARPANETO EM, ULIVI M, RONCELLA S, LANDT O, FERRARINI M, BOFFA LC. Effects in live cells of a *c-myc* anti-gene PNA linked to a nuclear localization signal. *Nat Biotechnol* 2000; **18**: 300–303.
- [11] DATTA HJ, CHAN PP, VASQUEZ KM, GUPTA RC, GLAZER PM. Triplex-induced recombination in human cell-free extracts. *J Biol Chem* 2001; **276**: 18018–18023.
- [12] DEMIDOV VV, POTAMAN VN, FRANK-KAMENETSKII MD, EGHOLM M, BUCHARD O, SONNICHSEN SH, NIELSEN PE. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 1310–1313.
- [13] DICKINSON LA, GULIZIA RJ, TRAUGER JW, BAIRD EE, MOSIER DE, GOTTESFELD JM, DERVAN PB. Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cells by synthetic DNA-binding ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12890–12895.
- [14] DIVIACCO S, RAPOZZI V, XODO L, HELENE C, QUADRIFOGLIO F, GIOVANNANGELI C. Site-directed inhibition of DNA replication by triple helix formation. *FASEB J* 2001; **15**: 2660–2668.
- [15] EGHOLM M, BUCHARDT O, CHRISTENSEN L, BEHRENS C, FREIER SM, DRIVER DA, BERG RH, KIM SK, NORDEN B, NIELSEN PE. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 1993; **365**: 566–568.
- [16] ESCUDE C, GIOVANNANGELI C, SUN JS, LLOYD DH, CHEN JK, GRYAZNOV SM, GARESTIER T, HELENE C. Stable triple helices formed by oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates inhibit transcription elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4365–4369.
- [17] ESPINAS ML, JIMENEZ-GARCIA E, MARTINEZ-BALBAS A, AZORIN F. Formation of triple-stranded DNA at d(GA.TC)_n sequences prevents nucleosome assembly and is hindered by nucleosomes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31807–31812.
- [18] FAMULOK M, JENNE A. Oligonucleotide libraries – variatio delectat. *Curr Opin Chem Biol* 1998; **2**: 320–327.
- [19] FARIA M, WOOD CD, PERROUAULT L, NELSON JS, WINTER A, WHITE MR, HELENE C, GIOVANNANGELI C. Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3862–3867.
- [20] FARIA M, WOOD CD, WHITE MR, HELENE C, GIOVANNANGELI C. Transcription inhibition induced by modified triple helix-forming oligonucleotides: a quantitative assay for evaluation in cells. *J Mol Biol* 2001; **306**: 15–24.
- [21] FARUQI AF, DATTA HJ, CARROLL D, SEIDMAN MM, GLAZER PM. Triple-helix formation induces recombination in mammalian cells via a nucleotide excision repair-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 990–1000.
- [22] FARUQI AF, EGHOLM M, GLAZER PM. Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1398–1403.
- [23] FELSENFELD G, DAVIES DR, RICH A. Formation of a three-stranded polynucleotide molecule. *J Am Chem Soc* 1957; **79**: 2023–2024.
- [24] FOSSELLA JA, KIM YJ, SHIH H, RICHARDS EG, FRESCO JR. Relative specificities in binding of Watson-Crick base pairs by third strand residues in a DNA pyrimidine triplex motif. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 4511–4515.
- [25] FRANK-KAMENETSKII M, MIRKIN S. Triplex DNA structures. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 65–95.

- [26] GAMBACORTI-PASSERINI C, MOLOGNI L, BERTAZZOLI C, LE COUTRE P, MARCHESI E, GRIGNANI F, NIELSEN PE. *In vitro* transcription and translation inhibition by anti-promyelocytic leukemia (PML)/retinoic acid receptor α and anti-PML peptide nucleic acid. *Blood* 1996; **88**: 1411–1417.
- [27] GIOVANNANGELI C, PERROUULT L, ESCUDE C, GRYAZNOV S, HELENE C. Efficient inhibition of transcription elongation *in vitro* by oligonucleotide phosphoramidates targeted to proviral HIV DNA. *J Mol Biol* 1996; **261**: 386–398.
- [28] GIOVANNANGELI C, THUONG NT, HELENE C. Oligonucleotide clamps arrest DNA synthesis on a single-stranded DNA target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10013–10017.
- [29] GOOD L, NIELSEN PE. Progress in developing PNA as a gene-targeted drug. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; **7**: 431–437.
- [30] GOTTESFELD JM, NEELY L, TRAUGER JW, BAIRD EE, DERVAN PB. Regulation of gene expression by small molecules. *Nature* 1997; **387**: 202–205.
- [31] GRAY DG, BASU S, WICKSTROM E. Transformed and immortalized cellular uptake of oligodeoxynucleoside phosphorothioates, 3'-alkylamino oligodeoxynucleotides, 2'-O-methyl oligoribonucleotides, oligodeoxynucleoside methylphosphonates, and peptide nucleic acids. *Biochem Pharmacol* 1997; **53**: 1465–1476.
- [32] GRIGORIEV M, PRASEUTH D, GUIEYSSE AL, ROBIN P, THUONG NT, HELENE C, HAREL-BELLAN A. Inhibition of gene expression by triple helix-directed DNA cross-linking at specific sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3501–3505.
- [33] GRIGORIEV M, PRASEUTH D, ROBIN P, HEMAR A, SAISON-BEHMOARAS T, DAUTRY-VARSAT A, THUONG NT, HELENE C, HAREL-BELLAN A. A triple helix-forming oligonucleotide-intercalator conjugate acts as a transcriptional repressor via inhibition of NF κ B binding to interleukin-2 receptor α -regulatory sequence. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3389–3395.
- [34] GUIEYSSE AL, PRASEUTH D, FRANCOIS JC, HELENE C. Inhibition of replication initiation by triple helix-forming oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **217**: 186–194.
- [35] HACIA JG, DERVAN PB, WOLD BJ. Inhibition of Klenow fragment DNA polymerase on double-helical templates by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Biochemistry* 1994; **33**: 6192–6200.
- [36] HANSON KD, SEDIVY JM. Analysis of biological selections for high-efficiency gene targeting. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 45–51.
- [37] HAVRE PA, GLAZER PM. Targeted mutagenesis of simian virus 40 DNA mediated by a triple helix-forming oligonucleotide. *J Virol* 1993; **67**: 7324–7331.
- [38] HELENE C, THUONG NT, HAREL-BELLAN A. Control of gene expression by triple helix-forming oligonucleotides. The antigene strategy. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **660**: 27–36.
- [39] HELENE C. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. *Anti-cancer Drug Des* 1991; **6**: 569–584.
- [40] HTUN H, DAHLBERG JE. Topology and formation of triple-stranded H-DNA. *Science* 1989; **243**: 1571–1576.
- [41] HUTVAGNER G, ZAMORE PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**: 225–232.
- [42] JOSEPH J, KANDALA JC, VEERAPANANE D, WEBER KT, GUNTAKA RV. Antiparallel polypurine phosphorothioate oligonucleotides form stable triplexes with the rat $\alpha 1(I)$ collagen gene promoter and inhibit transcription in cultured rat fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 2182–2188.
- [43] KNAUERT MP, GLAZER PM. Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 2243–2251.
- [44] LETAI AG, PALLADINO MA, FROMM E, RIZZO V, FRESCO JR. Specificity in formation of triple-stranded nucleic acid helical complexes: studies with agarose-linked polyribonucleotide affinity columns. *Biochemistry* 1988; **27**: 9108–9112.
- [45] LUO Z, MACRIS M, FARUQI AF, GLAZER PM. High-frequency intrachromosomal gene conversion induced by triplex-forming oligonucleotides microinjected into mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 9003–9008.
- [46] LYAMICHEV VI, MIRKIN SM, FRANK-KAMENETSKII MD. A pH-dependent structural transition in the homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA. *J Biomol Struct Dyn* 1985; **3**: 327–338.
- [47] MACAULAY VM, BATES PJ, McLEAN MJ, ROWLANDS MG, JENKINS TC, ASHWORTH A, NEIDLE S. Inhibition of aromatase expression by a psoralen-linked triplex-forming oligonucleotide targeted to a coding sequence. *FEBS Lett* 1995; **372**: 222–228.
- [48] MACRIS MA, GLAZER PM. Transcription dependence of chromosomal gene targeting by triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* 2003; **278**: 3357–3362.

- [49] MAHER LJ, DERVAN PB, WOLD B. Analysis of promoter-specific repression by triple-helical DNA complexes in a eukaryotic cell-free transcription system. *Biochemistry* 1992; **31**: 70–81.
- [50] MAHER LJ, WOLD B, DERVAN PB. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide directed triple-helix formation. *Science* 1989; **245**: 725–730.
- [51] MAJUMDAR A, KHORLIN A, DYATKINA N, LIN FL, POWELL J, LIU J, FEI Z, KHRIPINE Y, WATANABE KA, GEORGE J, GLAZER PM, SEIDMAN MM. Targeted gene knockout mediated by triple helix forming oligonucleotides. *Nat Genet* 1998; **20**: 212–214.
- [52] MAYFIELD C, EBBINGHAUS S, GEE J, JONES D, RODU B, SQUIBB M, MILLER D. Triplex formation by the human Ha-ras promoter inhibits Sp1 binding and *in vitro* transcription. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18232–18238.
- [53] MEZHEVAYA K, WINTERS T, NEUMANN R. Gene targeted DNA double-strand break induction by ¹²⁵I-labeled triplex-forming oligonucleotides is highly mutagenic following repair in human cells. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 4282–4290.
- [54] MOSER HE, DERVAN PB. Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* 1987; **238**: 645–650.
- [55] NEURATH MF, MAX EE, STROBER W. Pax5 (BSAP) regulates the murine immunoglobulin 3' α enhancer by suppressing binding of NF- α P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5336–5340.
- [56] NIELSEN PE. Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr Opin Biotechnol* 2001; **12**: 16–20.
- [57] NOONBERG SB, SCOTT GK, HUNT CA, HOGAN ME, BENZ CC. Inhibition of transcription factor binding to the HER2 promoter by triplex-forming oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 1994; **149**: 123–126.
- [58] PANYUTIN IG, NEUMANN RD. Sequence-specific DNA double-strand breaks induced by triplex forming 125I labeled oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 4979–4982.
- [59] PELEG M, KOPEL V, BOROWIEC JA, MANOR H. Formation of DNA triple helices inhibits DNA unwinding by the SV40 large T-antigen helicase. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 1292–1299.
- [60] PESCO J, SALMON JM, VIGO J, VIALLET P. Mag-indo 1 affinity for Ca(2+), compartmentalization and binding to proteins: the challenge of measuring Mg(2+) concentrations in living cells. *Anal Biochem* 2001; **290**: 221–231.
- [61] ROGERS FA, VASQUEZ KM, EGHOLM M, GLAZER PM. Site-directed recombination via bifunctional PNA-DNA conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16695–16700.
- [62] SAFFRAN WA, CANTOR CR, SMITH ED, MAGDI M. Psoralen damage-induced plasmid recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on RAD1 and RAD52. *Mutat Res* 1992; **274**: 1–9.
- [63] SAMADASHWILY GM, MIRKIN SM. Trapping DNA polymerases using triplex-forming oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 1994; **149**: 127–136.
- [64] SANCAR A, TANG MS. Nucleotide excision repair. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 905–921.
- [65] SEIDMAN MM, GLAZER PM. The potential for gene repair via triple helix formation. *J Clin Invest* 2003; **112**: 487–494.
- [66] SOYFER V, POTAMAN V. *Triple-Helical Nucleic Acids*. New York: Springer - Verlag New York, Inc. 1996: 101–116.
- [67] TAKASUGI M, GUENDOUZ A, CHASSIGNOL M, DECOU JL, LHOMME J, THUONG NT, HELENE C. Sequence-specific photo-induced cross-linking of the two strands of double-helical DNA by a psoralen covalently linked to a triple helix-forming oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5602–5606.
- [68] TEMPLETON NS. Cationic liposome-mediated gene delivery *in vivo*. *Biosci Rep*. 2002; **22**: 283–295.
- [69] TSUJIMURA T, MAHER VM, GODWIN AR, LISKAY RM, McCORMICK JJ. Frequency of intrachromosomal homologous recombination induced by UV radiation in normally repairing and excision repair-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1566–1570.
- [70] VASQUEZ KM, CHRISTENSEN J, LI L, FINCH RA, GLAZER PM. Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 5848–5853.
- [71] VASQUEZ KM, NARAYANAN L, GLAZER PM. Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science* 2000; **290**: 530–533.
- [72] VOINNET O. RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 444–451.
- [73] WANG G, GLAZER PM. Altered repair of targeted psoralen photoadducts in the context of an oligonucleotide-mediated triple helix. *J Biol Chem* 1995; **270**: 22595–22601.

- [74] WANG G, LEVY DD, SEIDMAN MM, GLAZER PM. Targeted mutagenesis in mammalian cells mediated by intracellular triple helix formation. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 1759–1768.
- [75] WANG G, SEIDMAN MM, GLAZER PM. Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* 1996; **271**: 802–805.
- [76] WANG G, XU X, PACE B, DEAN DA, GLAZER PM, CHAN P, GOODMAN SR, SHOKOLENKO I. Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated induction of human γ -globin gene expression. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2806–2813.
- [77] WANG YY, MAHER VM, LISKAY RM, McCORMICK JJ. Carcinogens can induce homologous recombination between duplicated chromosomal sequences in mouse L cells. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 196–202.
- [78] WARD JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol* 1994; **66**: 427–432.
- [79] WESTIN L, BLOMQUIST P, MILLIGAN JF, WRANGE O. Triple helix DNA alters nucleosomal histone-DNA interactions and acts as a nucleosome barrier. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 2184–2191.
- [80] WHITE S, SZEWCZYK JW, TURNER JM, BAIRD EE, DERVAN PB. Recognition of the four Watson-Crick base pairs in the DNA minor groove by synthetic ligands. *Nature* 1998; **391**: 468–471.
- [81] WOLD MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 61–92.
- [82] YOUNG SL, KRAWCZYK SH, MATTEUCCI MD, TOOLE JJ. Triple helix formation inhibits transcription elongation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10023–10026.
- [83] ZAIN R, MARCHAND C, SUN J, NGUYEN CH, BISAGNI E, GARESTIER T, HELENE C. Design of a triple-helix-specific cleaving reagent. *Chem Biol* 1999; **6**: 771–777.
- [84] POTOMAN VN. Applications of triple-stranded nucleic acid structures to DNA purification, detection and analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; **3**: 481–496.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 08.09.2004 r.

Przyjęto: 11.10.2004 r.

Adres autora: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź;

e-mail janusz@biol.uni.lodz.pl

ALCAM/CD166 (ACTIVATED LEUKOCYTE CELL ADHESION MOLECULE) – ADHEZYJNA CZĄSTECZKA REGULUJĄCA WZROST, ROZWÓJ, AGREGACJĘ ORAZ MIGRACJĘ KOMÓREK ZDROWYCH I NOWOTWOROWYCH*

ALCAM/CD166 (ACTIVATED LEUKOCYTE CELL ADHESION MOLECULE) – ADHESION MOLECULE AFFECTING GROWTH, DEVELOPMENT, AGGREGATION AND MIGRATION OF NORMAL AND NEOPLASTIC CELLS

Agnieszka JEZIERSKA, Tomasz MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych SGGW

Streszczenie: ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)/CD166, jest członkiem małej podgrupy transbłonowych glikoprotein należących do nadrodziny immunoglobulin. W pełni ukształtowane białka przypisane do tej grupy charakteryzują się występowaniem trzech fragmentów: zewnątrzkomórkowego, międzybłonowego oraz krótkiego regionu cytoplazmatycznego. ALCAM/CD166 uczestniczy w heterofilnej (ALCAM/CD166-CD6) oraz homofilnej (ALCAM/CD166-ALCAM/CD166) adhezji komórek w różnorodnych tkankach i liniach komórkowych. Uczestnictwo ALCAM/CD166 opisano w odniesieniu do procesów hematopoezy, rozwoju układu nerwowego oraz odpowiedzi immunologicznej. ALCAM/CD166 odgrywa również istotną rolę w procesie nowotworzenia. Odnotowano początkowy wzrost ekspresji tej adhezyjnej cząsteczki, a następnie utratę tworzonego przez ALCAM/CD166 kontaktu komórek w rozwoju guza raka prostaty, czerniaka złośliwego czy raka piersi. Artykuł ten podsumowuje obecne badania i teorie opisujące znaczenie ALCAM/CD166 w adhezji, wzroście i rozwoju prawidłowych oraz nowotworowych komórek.

Słowa kluczowe: ALCAM/CD166, adhezja komórkowa, nowotwory, przerzutowanie, MMP2.

Summary: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166) belongs to an immunoglobulin superfamily and is also a member of small subgroup of transmembrane proteins. The mature proteins from this group are determined by presence of three structural fragments: extracellular, transmembrane and short cytoplasmic region. ALCAM/CD166 mediates heterophilic (ALCAM/CD166-CD6) and homo-

*Badania własne zaprezentowane w niniejszej pracy dofinansowane były z grantu KBN – SPUB M NR 117/E-385/SP./COST/P-05/DZ145/2002-2004.

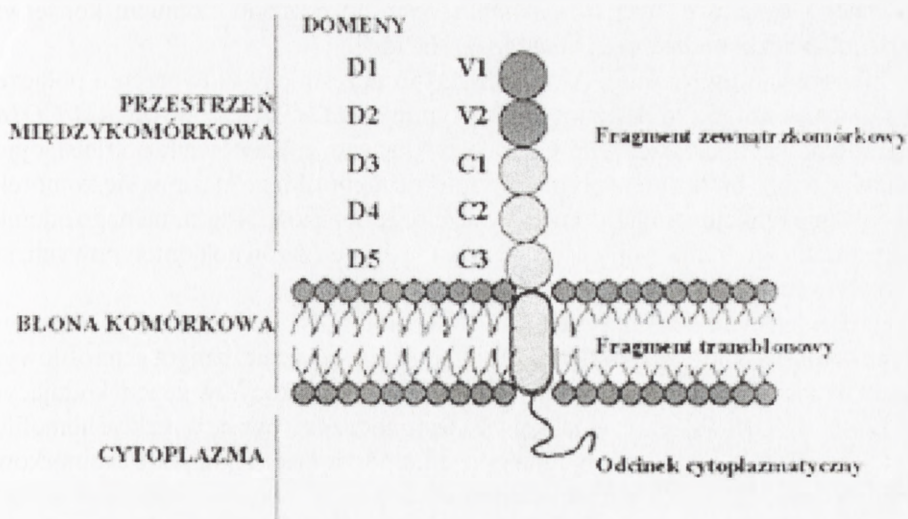
philic (ALCAM/CD166- ALCAM/CD166) cells adhesion in wide variety, both tissue and cultured cell lines. ALCAM/CD166 participation in hematopoiesis process, nerve developing and immune response was described. ALCAM/CD166 plays also important role in cancer development. Early increase of this adhesion molecule expression and later loss the ALCAM/CD166 mediated cells contact in tumour progression e.g. prostate cancer, malignant melanoma or breast cancer was noticed. The latest research and hypothesis describing ALCAM/CD166 involving in normal and neoplastic cells adhesion, growth and developing are recapitulated in this review.

Key words: ALCAM/CD166, cells adhesion, cancers, metastasis, MMP2.

1. CHARAKTERYSTYKA CZĄSTECZKI ALCAM/CD166

ALCAM/CD166-(*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*) należy do białek adhezyjnych tzw. CAM (*Cellular Adhesion Molecules*), które pełnią istotną rolę w utrzymaniu właściwej komunikacji pomiędzy komórkami. Zaliczamy do tej grupy między innymi cząsteczki: I-CAM 1, I-CAM 2 (*Intercellular Adhesion Molecules*) – cząsteczki adhezji międzykomórkowej, VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, PECAM/CD31 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłónka, N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji komórek nerwowych, Gly-CAM-1 (*Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1*) – cząsteczka adhezji komórkowej zależna od glikozylacji, H-CAM (*Human Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji komórek ludzkich, MAdCAM-1 (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej będąca adresyną błon śluzowych czy MECAM-1 (*Melanoma-associated Cell Adhesion Molecule*) – związana z czerniakiem cząsteczka adhezji komórek.

Mające masę 105 kDa ALCAM/CD166 jest członkiem małej podgrupy transbłonowych glikoprotein należących do nadrodziny immunoglobulin. W pełni ukształtowane białka przypisane do tej grupy charakteryzują się występowaniem trzech fragmentów. Pierwszy, zewnątrzkomórkowy jest zbudowany z pięciu elementów: dwóch dalszych N-końcowych domen zmiennych – V (*variable* – zmienny) oraz trzech, położonych bliżej błony cytoplazmatycznej domen stałych – C (*constant* – stały). Centralny odcinek stanowi hydrofobowy transbłonowy region zakończony trzecim fragmentem: krótką cytoplazmatyczną strukturą o różnej długości w zależności od typu białka (w przypadku ALCAM/CD166 liczy on 32 aminokwasy) (ryc. 1). Motyw: *VVCCC* określa ciąg domen immunoglobulinowych i stanowi charakterystykę tej podgrupy białek. Poza ALCAM/CD166 również CD146/MUC18 (MCAM/Mel-CAM) [35] oraz B-CAM/Lutheran (*Basal Cell Adhesion Molecule/ Lutheran blood group antygen*) [19] mają wymieniony wcześniej motyw. CD146/MUC18 jest pierwszym receptorem, u którego rozpoznano i opisano w 1989 roku charakterystyczną sekwencję *VVCCC* domen immunoglobulinowych. Natomiast klonowanie ALCAM/CD166 przeprowadzono w roku 1995, podczas gdy analogi ALCAM/CD166 u ptaków i ryb zostały wykryte już na początku lat 90.



RYCINA. 1. Budowa cząsteczki ALCAM/CD166

Odpowiednie dopasowanie sekwencji dostępnych w bazie *GENEBANK* z sekwencją aminokwasową białka ALCAM/CD166 ukazuje 26,7% identyczności oraz 37,4% podobieństwa z sekwencją aminokwasową białka CD146/MUC18 oraz 26,8% identyczności i 34,7% podobieństwa dla B-CAM/Lutheran. Identyczność sekwencji tych dwóch ostatnich białek wynosi 33,5%, a podobieństwo 42,2%. Homologia pomiędzy tymi trzema receptorami ograniczona jest do odcinka znajdującego się na zewnątrz i w przedziale międzybłonowym, a nie spotykamy jej we fragmencie cytoplazmatycznym.

Ludzkie receptory kodowane są przez pojedyncze kopie genów umiejscowionych na chromosomie 3q13.1-2 (ALCAM/CD166), 11q23.3 (CD146/MUC18) oraz 19q13.2 (B-CAM/Lutheran).

Alternatywne łączenie fragmentów RNA podczas transkrypcji generuje dwa lub trzy różne dojrzałe transkrypty CD146/MUC18. U ptaków takie transkrypty białka CD146/MUC18 kodują dwie błonowe izoforny z odmiennym: długim lub krótkim ogonem cytoplazmatycznym i jedną rozpuszczalną izofornę, która jest wydzielana przez komórkę. Nazwa B-CAM odnosi się do formy skróconej, dominującej glikoproteiny Lutheran, która została skrócona o 40 aminokwasów pochodzących z ogona cytoplazmatycznego [54].

Sekwencja aminokwasowa (583 aminokwasy) białka ALCAM/CD166 u kręgowców jest konserwatywna na prawie całej długości (w około 95%). Porównywalny ciąg sekwencji aminokwasowej białek B-CAM/Lutheran i CD146/MUC18 jest znacznie bardziej zróżnicowany, gdyż konserwatyzm zamyka się w przedziale 75–80% w odniesieniu do sekwencji mysiej, szurzej oraz ludzkiej. W przypadku wyższych kręgowców sekwencja innego białka adhezyjnego, E-kadheryny, jest znacznie mniej konserwatywna niż sekwencja ALCAM/CD166. Jeżeli jednak porównamy sekwencje aminokwasowe powyższych białek występujące u ewolucyjnie bardziej odległej

pręgowanej ryby akwariowej *Brachydanania verio*, to niższym stopniem konserwatywności odznaczał będzie się ALCAM/CD166 [54].

Jak wspomniano wcześniej, ALCAM/CD166 uczestniczy w tworzeniu połączeń między komórkami. Są to zależności homotypowe *ALCAM/CD166-ALCAM/CD166* lub heterotypowe *ALCAM/CD166-CD6*. Jak wykazano, zróżnicowana potranslacyjna glikolizylacja tego białka nie wpływa na zdolność homofilnego łączenia się komórek.

Mapowanie funkcjonalnych domen wykazało, że obecność N-terminalnego odcinka domeny immunoglobulinowej V1 jest wymagane dla obu zarówno homotypowych, jak i heterotypowych połączeń międzykomórkowych.

W przeciwieństwie do ALCAM/CD166, CD146/MUC18 uczestniczy w tworzeniu połączeń komórka-komórka tylko poprzez interakcje z wciąż nieznanym heterofilowym ligandem na sąsiadujących komórkach. Transfekowanie leukocytów genem kodującym ptasi CD146/MUC18 wskazuje, że jakkolwiek jest ono zaangażowane w reakcje homofilne komórka-komórka, to podtrzymuje interakcje komórka-macierz zewnątrzkomórkowa poprzez wiązanie czynnika wzrostu neurytów (ang. *NOF* – *neurite outgrowth factor*), zewnątrzkomórkowej glikoproteiny z rodziny laminin o masie 700 kDa. Również białko B-CAM/Lutheran pośredniczy w interakcjach komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, poprzez wiązanie laminin (białek charakterystycznych dla błon podstawnych), ale nie zanotowano zaangażowania tego białka w bezpośrednie połączenia komórka-komórka. Dwa niezależne zespoły badawcze odkryły charakterystyczne miejsca wiązania laminin do trzech błonowo-dystalnych (V1-C1) domen białka B-CAM/Lutheran i przypisały immunoglobulinowej domenie D3 decydującą rolę w tym procesie [19, 45]. Trzecia grupa naukowców przypisała miejsce wiązania laminin do błonowo-proksymalnej domeny C3 [58]. Pomimo że niezgodność ta jest zaskakująca, to nie można wykluczyć, że B-CAM/Lutheran ma dwa oddzielne i niezależne miejsca wiązania laminin.

ALCAM/CD166 jest homologiczny w 90% z kurzym białkiem adhezyjnym BEN/SC1/DM-GRASP [10, 47, 55]. Ponadto sekwencja białka ALCAM jest homologiczna w 93% z lipoproteinowym receptorem HB2, który jest lipoproteina o wysokiej gęstości [38].

2. WYSTĘPOWANIE ALCAM/CD166

Pomimo że ekspresja ALCAM/CD166 dotyczy wielu różnych tkanek, to z reguły powiązana jest z dynamicznym wzrostem oraz migracją komórek np. w czasie hematopoezy [43], angiogenezy [3], rozwoju grasicy [46], odpowiedzi układu immunologicznego [37], wzrostu neuronów [21, 49], rozwoju układu kostnego [8], rozwoju układu mięśniowego. ALCAM/CD166 występuje także w komórkach nowotworowych: włókniako-mięsaka, raka prostaty [32], czerniaka złośliwego [54] oraz raka piersi [24, 25]. Oprócz obecności omawianego białka w tkance guza stwierdzono występowanie białka CD166 w wielu nowotworowych liniach komórkowych: czerniaka (linii 530 czy BLM), raka płuc, okrężnicy, gruczołu krokowego [32] oraz piersi (MCF7, MDA MB 231) [24, 25]. Co ciekawe, badając komórki nienowotworowej linii HBL100 ludzkiego gruczołu sutkowego nie odnotowano ekspresji tego

białka [24]. Zawartość ALCAM/CD166 odkryto także podczas innych patologicznych procesów jak w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów, gdzie ALCAM/CD166 zlokalizowano na makrofagach płynu maziowego [54].

Ekspresja ALCAM/CD166 zachodzi na aktywowanych limfocytach T, monocytach, keratynocytach, tymocytach, fibroblastach, hepatocytach, komórkach trzustki: gronowych oraz wyspach Langerhansa, neuronach, komórkach nabłonkowych oraz hematopoetycznych komórkach progenitorowych [6, 43, 46, 47].

Szeroki profil ekspresji ALCAM/CD166 obserwowany jest podczas rozwoju ludzkiego zarodka. Udokumentowano, że ekspresja ALCAM/CD166 dotyczy subpopulacji komórek pnia w miejscu pierwotnej hematopoezy np. mezodermy okołoaortalnej, wątroby, grasicy oraz szpiku kostnego [54]. Co interesujące, cząsteczka ALCAM/CD166 zwykle występowała w specyficznej subpopulacji komórek. W większości przypadków ekspresja ALCAM/CD166 była przejściowa, co sugeruje, że podlega ona ścisłej kontroli. U wszystkich badanych zwierząt (ryby, ptaki, szczur, mysz, bydło) ALCAM/CD166 zaangażowany jest we wzrost, rozwój i utrzymanie centralnego i obwodowego układu nerwowego. U ptaków ALCAM/CD166 uczestniczy w unerwianiu mięśni poprzez zaangażowanie w proces wzrostu zakończeń nerwowych. Jego przejściowa ekspresja w mięśniach obserwowana jest tuż przed momentem wrastania nerwów, mniej więcej na tym samym poziomie, co po transekcji nerwów.

Arai i wsp.[3] badali wpływ ALCAM/CD166 na proces formowania kości i szpiku kostnego. Analizowano komórki pochodzące z ochrzęstnej, wykazujące właściwości pierwotnych komórek mezenchymalnych, które kierowane były na określone szlaki różnicowania, np. osteogenezy, tworzenia tkanki tłuszczowej, chrzęstnej czy podścieliska. Utrzymanie równowagi w niezróżnicowanej tkance mezenchymalnej oraz wstąpienie na drogę różnicowania uwarunkowane jest konfluencją oraz poprzez interakcję komórka-komórka. Ze względu na wymienione wcześniej właściwości ALCAM/CD166, jego ekspresję w hematopoetycznych komórkach macierzystych oraz udział w ekspansji prymitywnych hematopoetycznych komórek progenitorowych i decydującej roli we wroście prekursorowych komórkach śródbłonna, ciekawe wydaje się rozpoznanie roli, jaką pełni ta cząsteczka adhezyjna w różnicowaniu komórek ochrzęstnej. Arai i wsp. [3] opisują ALCAM/CD166 jako białko niezbędne w utrzymaniu potencjału różnicowania się komórek ochrzęstnej. Co interesujące, świeżo izolowane komórki ALCAM/CD166-pozytywne wykazywały wyższą aktywność proliferacyjną niż izolowane w ten sam sposób komórki ALCAM/CD166-negatywne. Po dodaniu ludzkiego rekombinowanego białka ALCAM/CD166 (ALCAM-Fc) lub mysiego rekombinowanego białka CD6 (CD6-Fc) proliferacja izolowanych ALCAM/CD166-pozytywnych komórek została częściowo zahamowana. Jest to dowód na wpływ ALCAM/CD166 na proliferację komórek ochrzęstnej. Dodatkowo zablokowanie homotypowych wiązań (ALCAM/CD166-ALCAM/CD166) przez dodanie ALCAM-Fc lub CD6-Fc stymulowało komórki o wysokiej ekspresji ALCAM/CD166 do formowania osteoblastów, migrację komórek progenitorowych osteoblastów w wewnętrzną warstwę okostnej oraz przyspieszenia

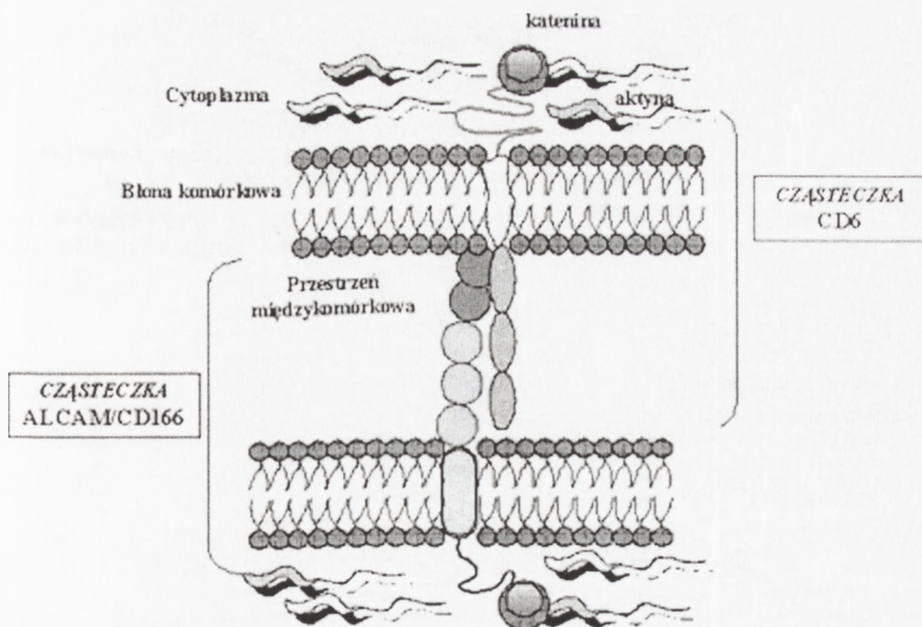
ekspresji alkalicznej fosfatazy i osadzanie się minerałów w procesie osteogenezy. Co istotne, rola cząsteczki ALCAM/CD166 nie ograniczała się tylko do tych procesów, ale wspomagała formowanie się sieci naczyń włosowatych przy udziale osteoklastów. Osteoklasty, z uwagi na funkcję absorpcji kości umożliwiają naczyniom krwionośnym penetrację chrząstki, a tym samym pomagają w tworzeniu przestrzeni szpikowej. Homotypowa adhezja komórkowa ALCAM/CD166-ALCAM/CD166 między komórkami chrzęstnej i śródbłonna może więc stymulować przyleganie naczyń krwionośnych do chrząstki.

3. ALCAM/CD166 TWORZY WIĄZANIA HOMOTYPOWE I HETEROTYPOWE

Początkowo ALCAM/CD166 zidentyfikowano jako ligand białka CD6, który zaangażowany jest w tworzenie połączenia pomiędzy nabłonkowymi komórkami grasicy a tymocytami [32]. Ludzkie białko CD6 (huCD6), występujące w dwóch izoformach o masie 100 kDa i 130 kDa, jest glikoproteiną prezentowaną na powierzchni tymocytów, dojrzałych limfocytów T oraz podrodzynie limfocytów B tak zwanych komórek B-1 [31]. CD6 składa się podobnie jak ALCAM/CD166 z trzech głównych fragmentów: ogona cytoplazmatycznego, transbłonowego odcinka oraz części zewnątrzkomórkowej. Ostatni wymieniony fragment zbudowany jest z trzech domen bogatych w cysteinę, tworzących receptor „zmiatacz” (*scavenger receptor cysteine rich*). Wzajemne wiązanie obu białek odbywa się pomiędzy domeną pierwszą V1, z pewnym udziałem domeny drugiej V2 białka ALCAM/CD166 oraz trzecią, najbliższą błonie komórkowej domeną cząsteczki CD6 [48] (ryc. 2).

Stwierdzono także fakt wiązania się ALCAM/CD166 do NgCAM (*Neuronal Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczki adhezji komórek neurogleju oraz lipoprotein o wysokiej gęstości [14, 38, 46]. Zidentyfikowany przez chromatografię powinowactwa NgCAM jest ptasim odpowiednikiem ssaczego białka L1-CAM. Stabilizacja wiązania komórka-komórka uwarunkowana jest w tym przypadku nie tylko przez zewnątrz-komórkowy fragment ALCAM, ale zależy również od wewnątrzkomórkowego współdziałania z fragmentem cytoplazmatycznym i transbłonowym białka ALCAM/CD166, α -kateniny, cytoszkieletu aktynowego, a także kinazy białkowej C [41, 56].

Jak opisano powyżej, glikoproteina ALCAM/CD166 tworzy połączenia międzykomórkowe o charakterze homofilnym (ALCAM/CD166-ALCAM/CD166) oraz heterofilnym (ALCAM/CD166-CD6). Aby wyjaśnić model działania ALCAM/CD166, wykorzystano monoklonalne przeciwciała anty-ALCAM/CD166 oraz serię N-terminalnych, delecyjnych mutantów ALCAM/CD166. Uzyskane wyniki wskazują na krytyczną rolę najbardziej dystalnej względem błony, V-typowej domeny V1 w adhezji komórkowej. Natomiast błonowo-proksymalne, immunoglobulinowe domeny typu -C, C2-C3, kontrolowały tworzenie „zlepów” na powierzchni komórki. Wzrost tworzenia

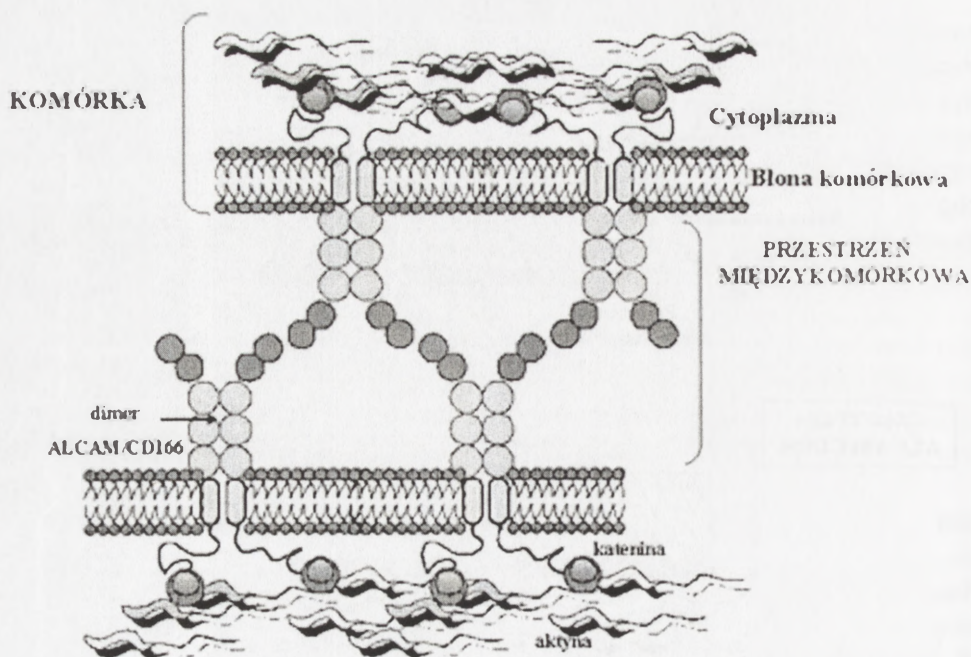


RYCINA 2. Schemat interakcji pomiędzy cząsteczkami ALCAM/CD166 i CD6

połączeń międzykomórkowych możliwy był przez włączanie ALCAM/CD166 w miejsca kontaktu komórka-komórka oraz poprzez oligomeryzację receptora przy udziale domen immunoglobulinowych typu C [27].

Równoczesna ekspresja transbłonowego delecyjnego mutanta ALCAM/CD166 (*DN-ALCAM/C1-C3*), który nie ma wiążących ligand domen V1 i V2, oraz dzikiego endogennego typu ALCAM/CD166 mającego wszystkie pięć zewnątrzkomórkowych domen V1V2C1C2C3, wstrzymuje tworzenie homotypowych (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*) połączeń komórka-komórka. Do tworzenia stabilnego wiązania między-komórkowego niezbędne są więc dwa moduły: pierwszym jest stworzenie na błonie komórkowej oligomeru zawierającego dwie cząsteczki ALCAM/CD166 połączone domenami typu -C-, C1-C3, drugim związanie do wolnej domeny typu -V-V1 takiej samej domeny znajdującej się w układzie oligomeru na sąsiadującej komórce. Ta funkcjonalna zgodność obu modułów jest wymagana dla tworzenia stabilnej sieci adhezji homotypowej komórka-komórka (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*) [27] (ryc. 3).

Jednak sama zewnątrzkomórkowa adhezja nie jest wystarczająca do stabilizacji połączeń komórkowych. Równie istotne są takie stabilizatory cytoplazmatyczne, jak: α -katenina, aktyna cytoszkieletu czy kinaza białkowa C, pomagające w usieciowaniu grupy komórek [41,56]. Sugestia, że funkcja ALCAM/CD166 w adhezji komórkowej jest kontrolowana przez zakotwiczenie go na cytoszkielecie aktynowym, wymaga poznania wciąż zagadkowego molekularnego mechanizmu tego procesu, podobnie jak składników biorących w nim udział.



RYCINA 3. Schemat homotypowej adhezji komórek *ALCAM/CD166* – *ALCAM/CD166*

Zastosowanie monoklonalnych przeciwciał blokujących, np. moAb J4-81, zgodnych z V-typową, wiążącą ligand domeną V1-2 umożliwiło tworzenie adhezji homotypowej komórka-komórka (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*), ale całkowicie hamowało tworzenie połączeń heterofilnych (*ALCAM/CD166-CD6*). Monoklonalne przeciwciało J4-81 indukowało zmiany konformacyjne białka *ALCAM/CD166*, co zwiększało komórkową adhezję i agregację. Komórki szpiczaka KG1 (CD6-negatywne) wykazujące wysoką, powierzchniową ekspresję *ALCAM/CD166* formowały homotypowe „zlepy” komórkowe, właśnie po aktywacji wyżej wymienionym przeciwciałem. Natomiast zastosowanie moAbJ4-81 w przypadku komórek linii K562 (choroba di Gugliemo), które formowały spontaniczne połączenia homotypowe pomiędzy ektotopowymi częściami *ALCAM/CD166*, nie wpłynęło na zwiększenie procesu sieciowania. Skuteczność działania tej zaprojektowanej immunoglobuliny zależała również od jej stężenia i temperatury. Tak, więc różny wpływ monoklonalnego przeciwciała J4-81 począwszy od hamowania heterotypowych interakcji *ALCAM/CD166-CD6*, przez brak wpływu na interakcje *ALCAM/CD166-ALCAM/CD166* w komórkach K562 do wzrostu agregacji w komórkach KG1, sugeruje różny mechanizm sieciowania komórek w zależności od typu interakcji.

Inne przeciwciało monoklonalne *moAb AZN-L50* wiążące dwie immunoglobulinowe błonowo-proksymalne (C2-C3) domeny typu C hamowało homotypowe interakcje (*ALCAM/CD166-CD166*), głównie przez zablokowanie oligomeryzacji cząsteczek *ALCAM/CD166* [27, 29].

Większość opublikowanych prac na temat ALCAM/CD166 dotyczy jego roli w homotypowych interakcjach (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*) między komórkami. Wiadomo, że te homofilne interakcje są wymagane, a wręcz niezbędne w miejscach związanych ze wzrostem i jego kontrolą, podobnie ma to miejsce podczas migracji komórek.

Uzyskane dane na temat ko-lokalizacji kadheryn i ALCAM/CD166 wskazują, że funkcja tego ostatniego białka jest wyciszana na korzyść homofilnych interakcji pomiędzy kadherynami. Zaburzenia w homotypowej siatce połączeń kadherynowych między komórkami nowotworowymi prowadzą do utraty adhezji i tym samym związane są z progresją nowotworu oraz ułatwieniem inwazyjności komórek guza [34]. Jednak przedstawione wyniki dla ALCAM/CD166 pokazują, że analogiczne homotypowe połączenia międzykomórkowe (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*) są powszechne lub indukowane *de novo* w niektórych złośliwych guzach i liniach komórkowych o różnym stopniu progresji nowotworowej [27, 28].

Jak wykazano, specyficzne wiązanie poddanego nadekspresji, pozbawionego N-końca delecyjnego mutantu ALCAM/CD166 (*DN-ALCAM/D3-5*) nie tylko hamowało homotypowe wiązanie komórek, ale także znosiło ograniczenia dla migracji komórek guza. W następstwie tego procesu możliwe stało się przejście ze stadium wzrostu guza pierwotnego do stadium tkanki inwazyjnej, z której uwolnione z homotypowych (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*) więzów komórki mają zdolność do zasiedlania wtórnych miejsc [27, 29].

Tak jak stabilizacja wiązania *ALCAM/CD166-ALCAM/CD166* przez inne niż ALCAM/CD166 białka, również destabilizacja tych interakcji wymaga zaangażowania molekuł zidentyfikowanych wstępnie jako proteazy [27, 29]. Nadekspresja proteaz i ich form prekursorowych jest często obserwowana w wielu rodzajach złośliwych guzów [7, 50, 53]. Hipoteza o współdziałaniu proteaz i ALCAM/CD166 poparta została badaniami nad współzależnością pomiędzy białkami proteolitycznymi a innymi częściami adhezyjnymi: E-kadheryną oraz L1-CAM. Usuwanie przez proteazy zewnątrzkomórkowych domen E-kadheryny czy L1-CAM hamuje adhezję sąsiadujących komórek, umożliwiając tym samym ich przemieszczanie [39, 42].

4. INTERAKCJA ALCAM/CD166-ALCAM/CD166 W ZŁOŚLIWYM CZERNIAKU

Obecność połączeń heterotypowych (*ALCAM/CD166-CD6*) oraz homotypowych (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*) między komórkami [27, 28] została potwierdzona w badaniach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, np. w komórkach CD6-negatywnych ludzkiego czerniaka obserwowano interakcje homofilne *ALCAM/CD166-ALCAM/CD166* skorelowane ze zdolnością do tworzenia charakterystycznych „zlepów” komórkowych [15]. ALCAM/CD166 wykryto w przerzutującej ludzkiej linii komórkowej czerniaka skóry, podczas gdy komórki linii nieprzerzutującej nie wykazywały ekspresji tego białka.

Van Kempen i wsp. [29] po raz pierwszy zaprezentowali dane dotyczące ekspresji ALCAM/CD166 oraz homotypowych zależności ALCAM/CD166-ALCAM/CD166 podczas progresji melanocytowego guza. Do badań przeznaczono wycinki z guzów zarówno łagodnych, jak i złośliwych. Ekspresja ALCAM/CD166 jednoznacznie obserwowana była w pionowej fazie wzrostu czerniaka złośliwego – VGP (*Vertical Growth Phase*) odpowiadającej III^o, IV^o, V^o Clarka. Wzrost ilości omawianego białka skorelowany był ze wzrostem stopnia zaawansowania wg skali Clarka oraz grubości guza. Co istotne, w łagodnych zmianach ekspresja ALCAM/CD166 występowała bardzo rzadko. Jedynie łagodna zmiana sinicowa (*cellular blue nevi*) pokazała błonową ekspresję ALCAM/CD166. Przejście z fazy RGP (*Radial Growth Phase*) czerniaka szerzącego się promieniście na powierzchni skóry (I^o i II^o Clarka) w fazę VGP (*Vertical Growth Phase*) jest decydującym momentem dla progresji guza. Czerniak sklasyfikowany jako guz rozwijający się wertykalnie ma zdolność do inwazji w skórze właściwej, a w następstwie tego procesu do przerzutowania. Guzy rozwijające się powierzchniowo nie mają styczności z naczyniami krwionośnymi, co znacznie utrudnia, a wręcz uniemożliwia komórkom nowotworowym przerzuty. Ekspresja białka ALCAM/CD166 ma miejsce prawie wyłącznie w guzach etapu VGP i nie dotyczy górnej, powierzchniowej warstwy czerniaka złośliwego (RGP). Ta ekspresja *de novo* w czasie rozwoju guza sugeruje wpływ ALCAM/CD166 na proces inwazji i progresji komórek czerniaka złośliwego. Najwyższe ilości omawianego białka w przebiegu czerniaka zaobserwowano w zaawansowanym guzie pierwotnym. Nato-miast w przerzutującym czerniaku poziom ALCAM/CD166 znacznie się zmniejszał. Być może ALCAM/CD166 jako cząsteczka adhezyjna umożliwia lokalną penetrację warstwy skóry, aby uzyskać dostęp do wrót przerzutu, jakimi są naczynia limfa-tyczne i krwionośne. Po osiągnięciu tego poziomu rozwoju nowotworu ALCAM/CD166 staje się zbędny.

Opisany dla ALCAM/CD166 profil selektywnej ekspresji oraz zależność tej ekspresji od grubości guza w złośliwym czerniaku ludzkiej skóry nie jest wyjątkowy. Przykładem mogą być integryny, które opisane zostały jako białka odgrywające rolę w inwazyjności różnych nowotworów [13, 26]. Integryny łączą dwa elementy szkieletu tkanek: białka macierzy pozakomórkowej oraz cytoszkielet poprzez białka adaptorowe, np. talinę czy α -aktynę [23]. W badaniach dotyczących czerniaka stwierdzono, że podjednostka $\beta 3$ heterodimeru, jakim jest integryna, związana jest z grubością guza oraz ze zdolnością do inwazji i przerzutowania. W analogii do ALCAM/CD166 ekspresja podjednostki $\beta 3$, receptora vitronektyny ($\alpha, \beta 3$), w złośliwym czerniaku jest ograniczona wyłącznie do komórek nowotworowych znajdujących się na etapie wzrostu pionowego VGP oraz komórek wykazujących cechy metastatyczne [1]. Profile ekspresji CD146/MUC18 oraz ICAM1 również wskazują na związek tych białek z wertykalnym wzrostem guza [40].

Ekspresja *de novo* ALCAM/CD166 w fazie wzrostu pionowego nie jest niepodważalnym dogmatem i nie była obserwowana we wszystkich neoplastycznych komórkach etapu VGP [28, 29], co mogło wynikać z heterogenności guzów czerniaka złośliwego. Ekspresja ALCAM/CD166 nie występowała w liniach komórkowych ludzkiego czerniaka oraz wywodzących się z nich heteroprzeszczepów, co jest dowodem na istnienie *in vivo* zjawiska przejściowej ekspresji związanej ze stopniem aktywności omawianego białka.

Systematyczny wzrost ekspresji ALCAM/CD166 podczas rozwoju guza pierwotnego, a następnie utrata tej ekspresji podczas przerzutowania złośliwego czerniaka tłumaczy koncepcję regulacji ekspresji tej adhezyjnej molekuly. Jednak natura bodźca aktywującego nadal pozostaje nieznana. Jedyne przesłanki na temat sygnału aktywującego sugerują, że dotyczy on pojedynczych komórek nowotworowych, ponieważ sąsiadujące z nimi komórki pozostają ALCAM/CD166-negatywne. Przedstawione przez van Kempena i wsp. [29] badania nad rolą ALCAM/CD166 dostarczają mocnych dowodów, że to adhezyjne białko jest stałym inwazyjnym składnikiem komórek czerniaka złośliwego i może być traktowane jako nowy marker progresji tego nowotworu.

5. EKSPRESJA ALCAM/CD166 W RAKU PROSTATY

Równie interesująca jest rola, jaką pełni ALCAM/CD166 w raku prostaty. Ekspresję ALCAM/CD166 opisano w pięciu liniach komórkowych raka prostaty: DU145, LNCAP, ALVA-31, PC3 oraz PPC-1 [56]. Nadekspresję omawianego białka odnotowano także w stopniu 4 i 5 raka prostaty wg skali Gleasona w porównaniu z ekspresją ALCAM/CD166 w łagodnej hiperplazji gruczołu krokowego [52].

Przeprowadzona przy użyciu GeneChipów, przez zespół Kristiansena [33] analiza transkryptów ALCAM/CD166 izolowanego ze skrawków mikroskopowych oraz hybrydyzacja par odcinków RNA pochodzących z komórek tkanek zdrowych i nowotworowych gruczołu krokowego wykazała, że ALCAM/CD166 ulegał ekspresji o różnym natężeniu w przybliżeniu w 22% badanych przypadków. Ekspresję tą potwierdzono immunohistochemicznie przy użyciu specyficznego przeciwciała monoklonalnego (używanego już wcześniej przez van Kempena i wsp. [29]) na poziomie białkowym. Aż 71% badanych skrawków mikroskopowych z miejsc chorobowo zmienionych wykazało wzrost stężenia białka ALCAM/CD166. Błonowa ekspresja ALCAM/CD166 w nabłonkowych komórkach stercza sugeruje uczestnictwo tego białka w fizjologicznych interakcjach komórka-komórka. Homotypowe połączenia komórkowe (*ALCAM/CD166-ALCAM/CD166*) wydają się najbardziej prawdopodobnym mechanizmem w tym procesie, ponieważ nie wykryto żadnej ekspresji CD6 w nabłonku prostaty. Tomita i wsp. [56] w liniach komórkowych raka prostaty zaobserwowali zależność międzykomórkowej lokalizacji ALCAM/CD166 od α -kateniny. W przypadku komórek z normalną ekspresją α -kateniny i funkcją E-kadheryny ALCAM/CD166 ulegał ekspresji podczas kontaktu komórka-komórka, natomiast w komórkach z utratą funkcji E-kadheryny, barwienie ALCAM/CD166 ujawniło jego obecność tylko w cytoplazmie. Przeciwciała użyte przez Kristiansena i wsp. [32] wykryły zróżnicowaną cytoplazmatyczną ekspresję ALCAM/CD166 w atypowych oraz inwazyjnych neoplastycznych strukturach nabłonkowych. W badaniach tych 81% guzów wykazało zwiększenie poziomu ogniskowej ekspresji ALCAM/CD166. W 19% analizowanych guzów prostaty nie odnotowano wzrostu stężenia białka ALCAM/

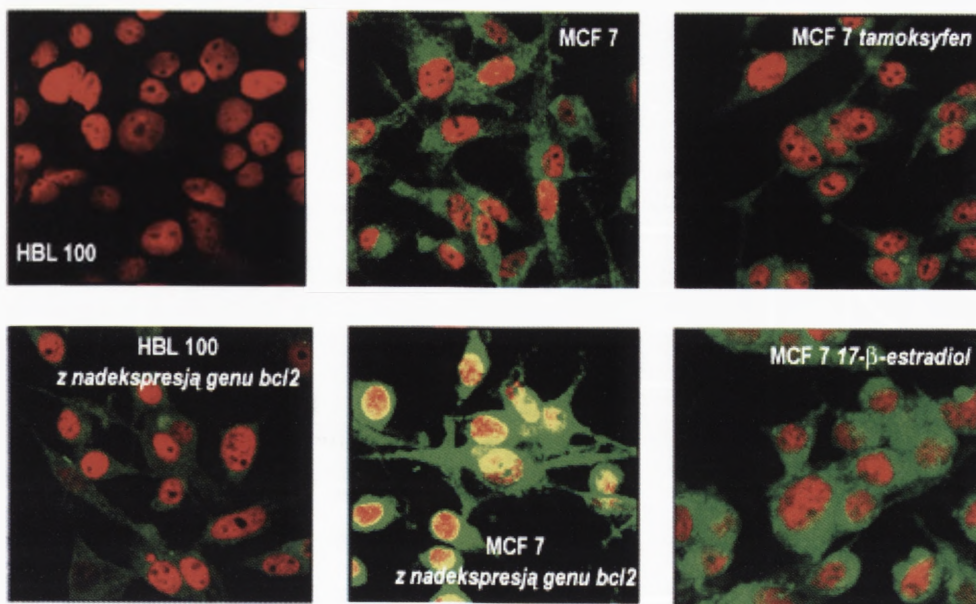
CD166, a wręcz utratę tej ekspresji preferencyjnie w guzach z wyższym stopniem w skali Gleasona w porównaniu z łagodnymi zmianami przerostowymi opisywanego gruczolu. Ta dwufazowa, zróżnicowana ekspresja ALCAM/CD166: wzrastająca w guzach z niskim stopniem w skali Gleasona i zanikająca w zmianach chorobowych ze stopniem wysokim jest trudna do interpretacji. W przeciwieństwie do dość jednoznacznych wyników dotyczących złośliwego czerniaka, gdzie ekspresja ALCAM/CD166 związana była z etapem VGP i tym samym z bardziej agresywnym fenotypem nowotworu, nie znaleziono żadnej prostej korelacji pomiędzy ekspresją ALCAM/CD166 a histologicznie określonym potencjałem złośliwości raka prostaty. Stwierdzono natomiast wpływ tej adhezyjnej molekuly na progresję metastatyczną po chemioterapii w liniach komórkowych włókniako-mięsaka [12].

Przedstawione tu rozbieżności możemy tłumaczyć różną biologicznie funkcją, jaką pełni ALCAM/CD166 w adhezji komórkowej różnych guzów. Możemy tylko spekulować na temat mechanizmów leżących u podstawy tych dwufazowych szlaków ekspresji w raku prostaty. Pomocne w analizie może być odkrycie ALCAM/CD166 zaangażowanego w proces angiogenezy, co pozwala domniemywać o roli wyżej wymienionego białka w formowaniu przewodowych struktur organizmu, niezależnie od ich nabłonkowego czy śródbłonkowego pochodzenia.

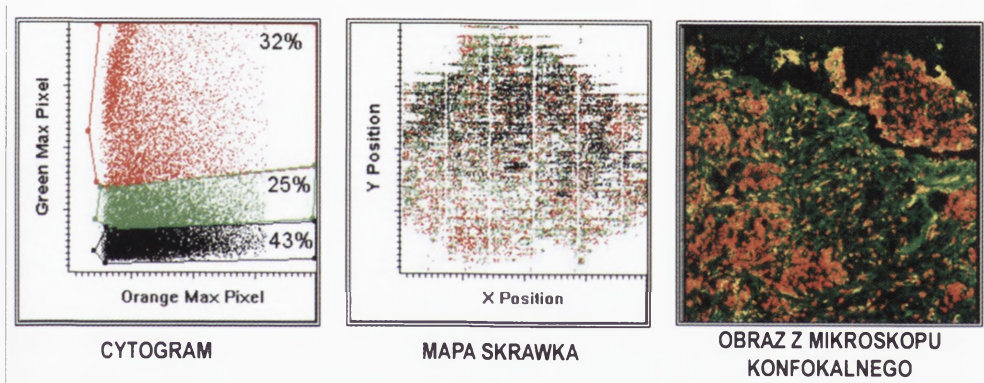
Mechanizm ten pozwala przypuszczać, że niska, podstawowa ekspresja ALCAM/CD166 obserwowana w zdrowym gruczole prostaty jest zależna od słabej proliferacji komórek. Wraz z pojawieniem się niskiego stopnia nowotworu gruczolu krokowego wzrasta stężenie ALCAM/CD166, co być może odzwierciedla proces tworzenia i rozprzestrzeniania się sieci przewodów. Natomiast stopniowy spadek ekspresji ALCAM/CD166 w przypadku guzów z wyższym stopniem w skali Gleasona jest najprawdopodobniej wynikiem porzucenia formowania przewodów na korzyść sitowatego, miększego lub pojedynczokomórkowego modelu inwazji.

6. INTERAKCJE *ALCAM/CD166-ALCAM/CD166* W RAKU PIERSI

Z uwagi na wykrycie związku pomiędzy ekspresją ALCAM/CD166 a progresją czerniaka złośliwego czy raka prostaty istotne wydaje się poznanie wpływu, jaki ALCAM/CD166 wywiera na inne zmiany neoplastyczne. Pierwsze badania nad nowotworowymi liniami komórkowymi wykazały ekspresję ALCAM/CD166 także w liniach: włókniako-mięsaka (HT-1080), kostniako-mięsaka (143B, PML, BK, TK) oraz raka piersi (MCF-7) [29]. U kobiet rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym. Pomimo rozpoznania choroby i rozpoczęcia leczenia radykalnego, a także zabiegów chemioterapii oraz hormonoterapii, niektóre przypadki raka sutka zakończone są zgonem pacjentek. Najczęstszą przyczyną zgonów kobiet poddanych zabiegom chirurgicznym, np. zmodyfikowanej amputacji piersi sposobem Pateya (wycięcie gruczolu piersiowego



RYCINA 4. Ekspresja białka ALCAM/CD166 w liniach komórkowych gruczołu sutkowego (HBL100), raka piersi (MCF7) i tych samych liniach stransfekowanych plazmidem zawierającym ludzki gen *bcl2* – główny inhibitor apoptozy oraz linii MCF7 traktowanej przez 6 dni: 17-β-estradiolem (1 mM) i tamoksifenem (1 mM) (antyestrogenem). Zdjęcia uzyskano przy użyciu mikroskopu konfokalnego: fluorescencja czerwona (7-aminoaktynomycyna D) uwidacznia DNA, natomiast fluorescencja zielona (wtórne przeciwciało sprzężone z AlexaFluor→488) odzwierciedla obecność białka ALCAM/CD166



RYCINA 5. Ekspresja białka ALCAM/CD166 w skrawku guza raka piersi. Na cytogramie przedstawiono procent komórek o najwyższej (kolor czerwony), średniej (kolor zielony), i niskiej (kolor czarny), ekspresji ALCAM/CD166. Mapa skrawka guza raka piersi odzwierciedla lokalizację wcześniej wymienionych komórek. Cytogram i mapę skrawka wykonano przy użyciu laserowej cytometrii skaningowej. Na zdjęciu uzyskanym przy użyciu mikroskopu konfokalnego: fluorescencja czerwona odpowiada DNA wybarwionemu 7-aminoaktynomycyną D, natomiast fluorescencja zielona (wtórne przeciwciało sprzężone z AlexaFluor→488) odzwierciedla obecność białka ALCAM/CD166

wraz z węzłami chłonnymi pachy, bez usuwania mięśni piersiowych) pozostaje progresja nowotworu. Istnieje ryzyko, że w momencie podejmowania leczenia radykalnego u chorych na raka sutka występuje zjawisko mikroprzerzutów do węzłów chłonnych, a co za tym idzie innych narządów: płuc czy kości. Istotne jest poznanie czynników prognostycznych, pozwalających określić rokowanie niezależnie od rozpoczęcia leczenia i predykcyjnych, które określają prawdopodobieństwo uzyskania remisji w przypadku zastosowania określonej metody leczenia. Zasadnicze znaczenie mają tu czynniki, takie jak zaawansowanie wg klasyfikacji TNM: stan regionalnych węzłów chłonnych i wielkość guza, obecność receptorów estrogenowych [2, 4, 22, 44] i progesteronowych [11,20], typ histologiczny, stopień złośliwości histologicznej wg skali Richardsona-Blooma, protoonkogeny, onkogeny, geny supresorowe oraz ich produkty: EGFR (receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu) [33], c-erbB-2/HER 2 (receptor dla komórkowego czynnika wzrostu), c-myc [57], ps2, p53 [5], MDR-1, BRCA-1, BRCA-2 [22], markery aktywności proliferacyjnej guza: indeks mitotyczny (MI), indeks znakowanej tymidyny (TLI), frakcja komórek w fazie S (SPF), PCNA, Ki-67; ploidia DNA, markery angiogenezy; czynniki regulujące apoptozę zarówno promotory, jak i inhibitory, np. białka z rodziny BCL2 czy markery wysokiego ryzyka przerzutowania: katepsyna-D, nm-23, aktywator plazminogenu (UPA) [30].

Ocena ekspresji białka zaangażowanego zarówno w adhezję, jak i przerzuty, jakim jest ALCAM/CD166, umożliwi być może poznanie roli ALCAM/CD166 w procesie przerzutowania w przypadku raka piersi. Dotychczasowe własne obserwacje na liniach komórkowych raka piersi: MCF-7 [9] oraz MDA MB 231 i linii referencyjnej HBL 100 (nienowotworowej – gdzie jedynie unieśmierteliono komórki przez ich transfekcję wirusem SV40), wykazały całkowity brak ekspresji ALCAM/CD166 w linii HBL100, a wysoką ekspresję tego białka w estrogenozależnej linii MCF-7 i MDA MB 231 (ryc. 4). Stosując laserową cytometrię skaningową i mikroskopię konfokalną stwierdziliśmy duże zróżnicowanie subpopulacji komórek w skrawkach tkanki guza raka piersi pod względem ekspresji ALCAM/CD166 (ryc. 5). W przypadkach gdy odnotowano przerzuty do węzłów chłonnych, poziom ALCAM/CD166 był niższy niż w guzach niemietastatycznych. Zawartość ALCAM/CD166 wydaje się również zależeć od stymulacji przez streoidy płciowe oraz od poziomu receptorów estrogenowych (ER- α , ER- β) oraz progesta-genowych (PgR), co odnotowaliśmy zarówno w odniesieniu do tkanki guza, jak i linii komórkowych MCF-7 i MDA MB 231(ryc. 4). Jest to o tyle istotne, że receptory dla tych hormonów są powszechnie stosowanym markerem uzyskania remisji po zastosowaniu hormonoterapii, która w przypadku obecności obu receptorów sięga nawet 80% [51]. Uzyskanie komórek z nadekspresją białka BCL-2, głównego inhibitora apoptozy poprzez stransfekowanie wyżej wymienionych linii komórkowych raka piersi plazmidem zawierającym ludzki gen *bcl2*, ujawniło dodatni wpływ tego białka na ekspresję ALCAM/CD166, która pojawiła się nawet w nienowotworowej linii HBL100 (ryc. 4).

Inne uzyskane wyniki sugerują, że w przypadku nowotworów piersi, ALCAM/CD166, w zależności od rodzaju białka, z jakim oddziałuje, ma w prognozowaniu choroby znaczenie pozytywne (utrzymanie sieciowania komórek w miejscu guza pierwotnego dzięki interakcji z kateninami) lub negatywne (degradujące ALCAM/CD166 działanie

MMP2 – metaloproteinazą II macierzy międzykomórkowej umożliwiające metastazę) [16, 17, 18]. Zasygnalizowane w artykule badania wyjaśniają tylko część odgrywanej przez ALCAM/CD166 roli w progresji raka piersi. Pełniejsze zrozumienie mechanizmu działania ALCAM/CD166 wymaga dalszych badań.

7. PODSUMOWANIE

Dystrybucję ALCAM/CD166 badano w odniesieniu do różnych fizjologicznych stadiów rozwojowych: płodowego, noworodkowego i organizmu dojrzałego oraz stanów patologicznych. W warunkach fizjologicznych ALCAM/CD166 poprzez tworzenie połączeń międzykomórkowych jest jednym z białek utrzymujących prawidłową strukturę tkanki. Ten pozytywny efekt działania ALCAM/CD166 ulega zmianie w tkance nowotworowej. Spadek ekspresji adhezyjnej cząsteczki ALCAM/CD166 ułatwia przerzutowanie wskutek utraty kontaktu komórka-komórka.

Uważa się, że w przypadku niektórych nowotworów, np. czerniaka złośliwego, wzrost poziomu ALCAM/CD166 jest wskaźnikiem metastatycznym. Mamy tu do czynienia ze swoistym „*paradoksem ALCAM*”, gdyż jako białko adhezyjne powinno ono zapewniać ścisły kontakt pomiędzy komórkami i powinno utrudniać ich uwalnianie z ogniska pierwotnego. Jest to jednakże tylko pozorny paradoks. Wzrost ekspresji ALCAM/CD166 w komórkach ogniska pierwotnego prowadzi do znaczącej przewagi homofilnych interakcji *ALCAM/CD166-ALCAM/CD166* pomiędzy stykającymi się komórkami. Bezpośrednim następstwem wzrostu ekspresji ALCAM/CD166 jest wzrost ekspresji MMP2, która proteolitycznie odcina zewnątrzkomórkową domenę ALCAM/CD166, umożliwiając uwolnienie komórki z ogniska pierwotnego. Co więcej odcięte przez MMP2 wolne N-terminalne domeny zewnątrzkomórkowe poprzez interakcje homofilne z domenami związanymi z błoną komórkową blokują możliwość adhezji, potęgując przez to proces uwalniania komórek z ogniska pierwotnego. Ekspresja ALCAM/CD166 przez komórki migrujące ułatwia ich adhezję do komórek śródbłonna naczyniowego i tkanek docelowych. Jest bardzo prawdopodobne, iż wzrost ekspresji ALCAM/CD166 jest jednym z pierwszych zwiastunów przerzutowania. Jest to jednak stan przejściowy, gdyż wzrost aktywności MMP2 prowadzi do degradacji ALCAM/CD166. W przypadku raka piersi stwierdza się dodatnią korelację pomiędzy ekspresją ALCAM/CD166 a MMP2 i generalnie poziom obydwu białek jest wyższy w komórkach guzów nieinwazyjnych. Niski poziom ALCAM/CD166 w metastatycznych guzach raka piersi prawdopodobnie umożliwia uwalnianie komórek nowotworowych z ogniska pierwotnego i tworzenie przerzutów w innych tkankach.

LITERATURA

- [1] ALBELDA SM, METTE SA ELDER DE, STEWARD R, DAMIANOVICH L, HERLYN M, BUCK CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990; **50**: 6757–6764.
- [2] ANDERSON WF, CHU KC, CHATTERJEE N, BRAWLEY O, BRINTON LA. Tumor variants by hormone receptors expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology and results database. *J Clin Onco* 2001; **19**: 18–27.
- [3] ARAI F, OHNEDA O, MIYAMOTO T, ZHANG XO, SUDA T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med* 2002; **195**: 1549–1563.
- [4] BEENKEN SW, BLAND KI. Biomarkers for breast cancer. *Minerva Chir* 2002; 437–438.
- [5] BEENKEN SW, GRIZZLE WE, CROWE DR, CONNER MG, WEISS HL, SELLERS MT. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erb-B2 and p-53. *Ann Surg* 2001; **233**: 630–638.
- [6] BOWEN MA, PATEL DD, LI X, MODRELL B, MALACKO AR, WANG WC, MARQUARDT H, NEUBAUER M, PESANDO JM, FRANCKE U. Cloning, mapping and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 1995; **18**: 2213–2220.
- [7] BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 267–283.
- [8] BRUDER SP, RICALTON NS, BOYNTON RE, CONNOLLY TJ, JAISWAL N, ZAIA J, BARRY FP. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 655–663.
- [9] BUDTZ PE. Role of proliferation and apoptosis in net growth rates of human breast cancer cells (MCF-7) treated with oestradiol and/or tamoxifen. *Cell Prolif* 1999; **32**: 289–302.
- [10] BURNS FR, von KANNEN S, GUY L, RAPER JA, KAMHOLZ J, CHANG S. DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. *Neuron* 1991; **7**: 209–220.
- [11] CAMERON DA, RITCHIE AA, MILLER WR. The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and response to tamoxifen. *Eur J Cancer* 2001; **31**: 1545–1553.
- [12] CHOI S, KOBAYASHI M, WANG J, HABELHAH H, OKADA F, HAMADA J, MORIUCHI T, TOTSUCHI Y, HOSOKAWA M. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and annexin II are involved in the metastatic progression of tumor cells after chemotherapy with Adriamycin. *Clin Exp Metastasis* 2000; **18**: 45–50.
- [13] CLEZARDIN P. Recent insights in to the role of integrins in cancer metastasis. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 541–548.
- [14] DeBERNARDO AP, CHANG S. Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J Cell Biol* 1996; **133**: 657–666.
- [15] DEGEN WG, van KEMPEN LC, GIJZEN EG, VAN GRONINGEN JJ, VAN KOOYK Y, BLOEMERS HP, SWART GW. MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am J Pathol* 1998; **152**: 805–813.
- [16] DERYUGINA EI, RATNIKOV B, MONOSOV E, POSTNOVA TI, DISCIPIO R, SMITH JW, STRONGIN AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha v \beta 3$ promotes maturation of MMP2 in breast carcinoma cell. *Exp Cell Res* 2001; **263**: 209–223.
- [17] DERYUGINA EI, BOURDON MA, LUO GX, REISFELD RA, STRONGIN A. Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Res* 1997a; **17**: 3201–3210.
- [18] DERYUGINA EI, BOURDON MA, LUO GX, REISFELD RA, STRONGIN A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *J Cell Sci* 1997b; **110**: 2473–2482.
- [19] EI NEMER W, GANE P, COLIN Y, D'AMBROSIO, MA, CALLEBAUT I, CARTRON JP, Van KIM CL. Characterization of the laminin binding domains of the Lutheran blood glycoprotein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23757–23762.
- [20] FIETS WE, BLANKENSTEIN MA, STRUIKMANS H, RUITENBERG HM, NORTIER JWR. The prognostic value of hormone receptor detection by enzyme immunoassay and immunohistochemistry: a prospective study in patients with early breast cancer. *Inter J Biol Markers* 2002; **17**: 24–32.
- [21] HEFFRON DS, GOLDEN JA. DM-GRASP is necessary for nonradial cell migration during chick diencephalic development. *J Neurosci* 2000; **20**: 2287–2294.

- [22] HILAKIVI-CLARKE L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 4993–5001.
- [23] JAKÓBISIĄK I WSP. *Immunologia*. 1998.
- [24] JEZIEŃSKA A, PIETRUSZKIEWICZ J, OLSZEWSKI WP, GODLEWSKI MM, MOTYL T. Application of Laser Scanning Cytometry and Confocal Microscopy in analysis of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166) expression in breast cancer cells. Poster w: 1st International Workshop Slide-Based Cytometry (SBC). Leipzig, Niemcy, 15–17 maj 2003.
- [25] JEZIEŃSKA A, OLSZEWSKI WP, PIETRUSZKIEWICZ J, OLSZEWSKI W, MOTYL T. Factors affecting ALCAM/CD166 expression in breast cancer. *Predictive Oncology and Intervention Strategies; Molecular Basis of Oncogenesis and Cancer Control*, 7–10 luty 2004.
- [26] KELLY P, PARISE L, JULIANO R. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 101–106.
- [27] van KEMPEN LC, NIELISSEN JM, DEGEN WG, TORENSMA R, WEIDLE UH, BLOEMERS HP, FIGDOR CG, SWART GW. Molecular basis for the homophilic Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)-ALCAM interactions. *J Biol Chem* 2001; **276**: 25783–25790.
- [28] van KEMPEN LC, van den OORD JJ, van MUIJEN GN, WEIDLE UH, BLOEMERS HP, SWART GW. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 2000; **156**: 769–774.
- [29] van KEMPEN LC. The ALCAM paradox. Cell adhesion and melanoma metastasis. Ph.D Thesis 2001. University of Nijmegen, Holandia.
- [30] KONECNY G, UNTCH M, ARBOLEDA J, WILSON C, KAHLERT S, BOETTCHER B, FELBER B, BERYT M, LUDE S, HEPP H, SLAMON D, PEGRAM M. HER-2/neu and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 2448–2457.
- [31] KONNO A, AHN JS, KITAMURA H, HAMILTON MJ, GEBE JA, ARUFFO A, DAVIS WC. Tissue distribution of CD6 and CD6 ligand in cattle: expression of CD6 ligand (CD166) in the autonomic nervous system of cattle and the human. *J Leuk Biol* 2001; **69**: 994–950.
- [32] KRISTIANSEN G, PILARSKY C, WISSMANN C, STEPHAN C, WEISSBACH L, LOY V, LOENING S, DIETEL M, ROSENTHAL A. ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. *The Prostate* 2003; **54**: 34–43.
- [33] LANTZSCH T, HELFER L, KRAUSE U, KEHL A, GOEPEL C, KOELBL H, DUNST J, LAMPE D. The correlation between immunohistochemically-detected markers of angiogenesis and serum vascular endothelial growth factor in patients with breast cancer. *Anti-cancer Res* 2002; **22**: 1925–1928.
- [34] LAUWAET T, OLIVEIRA MJ, MAREEL M, LEROY A. Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganism. *Microbes Infect* 2000; **2**: 923–931.
- [35] LEHMANN JM, RIETHMULLER G, JOHNSON JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 9891–9895.
- [36] LEPPERT CA, DICKMANN H, PAUL C, LEASSING U, MARX M, BASTMEYER M, STUERMER CA. Neurolin Ig domain 2 participates in retinal axon guidance and Ig domains 1 and 3 in fasciculation. *J Cell Biol* 1999; **144**: 339–349.
- [37] LEVESQUE MC, HEINLY CS, WHICHARD LP, PATEL DD. Cytokine-regulated expression of activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) on monocyte-lineage cells and in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 2221–2229.
- [38] MATSUMOTO A, MITCHELL A, KURATA H, PYLE L, KONDO K, ITAKURA H, FIDGE N. Cloning and characterization of HB2, a candidate high density lipoprotein receptor. Sequence homology with members of the immunoglobulin superfamily of membrane proteins. *J Biol Chem* 1997; **272**: 16778–16782.
- [39] MECHTERSHEIMER S, GUTWEIN P, AGMON-LEVIN N, STOECK A, OLSZEWSKI M, RIEDLE S, FOGEL M, LEMMON V, ALTEVOGT P. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 2001; **155**: 661–673.
- [40] NATALI PG, HAMBY CV, FELDING-HABERMANN B, LIANG B, NICOTRA MR, DI FILIPPO F, GINNARELLI D, TEMONI, FERRONE S. Clinical significance of $\alpha(v)\beta 3$ integrin and intracellular adhesion molecule-1 in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 1997; **57**: 1554–1560.
- [41] NIELSEN JM, PETERS IM, de GROOTH BG, van KOOYK Y, FIGDOR CG. Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 2057–2068.
- [42] NOE V, FINGLETON B, JACOBS K, CRAWFORD HC, VERMEULEN S, STEELANT W, BRUYNEEL E, MATRISIAN LM, MAREEL M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin. *J Cell Sci* 2001; **114**: 111–118.

- [43] OHNEDA O, OHNEDA K, ARAI F, LEE J, MIYAMOTO T, FUKUSHIMA Y, DOWBENKO D, LASKY LA, SUDA T. ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 2001; **98**: 2134–2142.
- [44] OSBORNE CK, SHIFF R, FUQUA SAW, SHOU J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 4338–4342.
- [45] PARSONS SF, LEE G, SPRING FA, WILLING TN, PETERS LL, GIMM JA, TANNER MJ, MOCHAN-DAS N, ANSTEE DJ, CHASIS JA. Lutheran blood group glycoprotein and its newly characterized mouse homologue specifically bind alpha5 chain-containing human laminin with high affinity. *Blood* 2001; **97**: 312–320.
- [46] PATEL DD, WEE SF, WHICHARD LP, BOWEN MA, PESANDO JM, ARUFFO A, HAYNES BF. Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human epithelial cells. *J Exp Med* 1995; **181**: 1563–1586.
- [47] POURQUIE O, CORBEL C, Le CAER JP, ROSSIER J, LE DOUARIN NM. BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is expressed in a variety of developing systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5261–5265.
- [48] RUPNIEWSKA ZM, DMOSZYŃSKA M, ROLIŃSKI J. Cząsteczki CD5 i CD6 – podobieństwa i różnice. *Pol Arch Med Wewn* 1999; **C1**: 3.
- [49] SEKINE-AIZAWA Y, OMOWI A, FUJITA SC. MuSC, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is expressed in neurons of a subset of cranial sensory ganglia in the mouse embryo. *Eur J Neurosci* 1998; **10**: 2810–2824.
- [50] SHANKAVARAM UT, LAI WC, NETZEL-ARNET S, MANGAN PR, ARDANS JA, CATERINA N, STE-TLER-STVENSON WG, BIRKEDAL-HANSEN H, WHAL LM. Monocyte membrane type 1-matrix metalloproteinase: prostaglandin-dependent regulation and role in metalloproteinase-2 activation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 19027–19032.
- [51] SONG RX-D, MOR G, NAFTOLIN F. Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17-beta-estradiol. *J Nation Cancer Institute* 2001; **93**: 1714–1723.
- [52] STAMEY TA, WARRINGTON JA, CALDWELL MC, CHEN Z, FAN Z, MAHADEVAPPA M, MC NEAL JE, NOLLEY R, ZHANG Z. Molecular genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancers compared to benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2001; **166**: 2171–2177.
- [53] STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 463–516.
- [54] SWART GW. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (CD166/ALCAM): Developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 2002; **81**: 313–321.
- [55] TANAKA H, MATSUI T, AGATA A, TOMURA M, KUBOTA I, MCFARLAND KC, KHOR B, LEE A, PHILIPS HS, SHELTON DL. Molecular cloning and expression of a novel adhesion molecule, SC1. *Neuron* 1991; **7**: 535–545.
- [56] TOMITA K, van BOKHOVEN A, JANSEN CF, BUSSEMAKERS MJ, SCHALKEN JA. Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **267**: 870–874.
- [57] YANG DC, ELLIOT RL, HEAD JF. Gene targets of antisense therapies in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2002; **6**: 375–385.
- [58] ZEN Q, COTTMAN M, TRUSKEY G, FRASER R, TELEN MJ. Critical factors in basal cell adhesion molecule/Lutheran-mediated adhesion to laminin. *J Biol Chem* 1999; **274**: 728–734.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 07.07.2004 r.

Przyjęto: 08.09.2004 r.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

e-mail: t_motyl@hotmail.com

PĄCZEK OGONOWY W ROZWOJU ZARODKÓW KRĘGOWCÓW

TAIL BUD IN DEVELOPMENT OF VERTEBRATE EMBRYOS

Zofia BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA

Zakład Histologii i Embriologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. U kręgowców po zakończonej gastrulacji tylny koniec zarodka, zwany pączkiem ogonowym, stanowi masa niezróżnicowanych komórek mezenchymatycznych, z których tworzą się ledźwiowo-krzyżowe i ogonowe odcinki ciała. Komórki mezenchymatyczne mają potencję do różnicowania się w szereg różnych tkanek, w tym wtórnej cewy nerwowej, jelita ogonowego, somitów i ich pochodnych. Opiszano niektóre mechanizmy molekularne związane z różnicowaniem się pączka ogonowego i omówiono rolę pączka ogonowego jako organizatora tylnej części ciała kręgowca.

Słowa kluczowe: pączek ogonowy, organizator ogonowy, wtórna neurulacja, somitogeneza.

Summary: After gastrulation the caudal part of vertebrate embryo, designated tail bud, forms a mass of undifferentiated mesenchymal cells, from which the lumbosacral and caudal parts of the body develop. The mesenchymal cells have the potential to give rise to a variety of different tissues including the posterior or „secondary” neural tube, tail gut, and somites and their derivatives. Some molecular mechanisms involved in the tail bud differentiation were described and the role of tail bud as organizer of caudal part of the vertebrate body is discussed.

Key words: tail bud, caudal organizer, secondary neurulation, somitogenesis.

WSTĘP

Pączek ogonowy występuje w rozwoju wszystkich kręgowców, z człowiekiem włącznie, po zakończonej gastrulacji jako cebulkowate zgrubienie na tylnym [ogonowym] końcu cewy nerwowej zarodka. Jest to skupisko komórek o charakterze mezenchymatycznym, morfologicznie jednolitych, pokryte od zewnątrz nabłonkiem ektodermalnym, przechodzące bez widocznych granic w struktury osiowe utworzone wcześniej

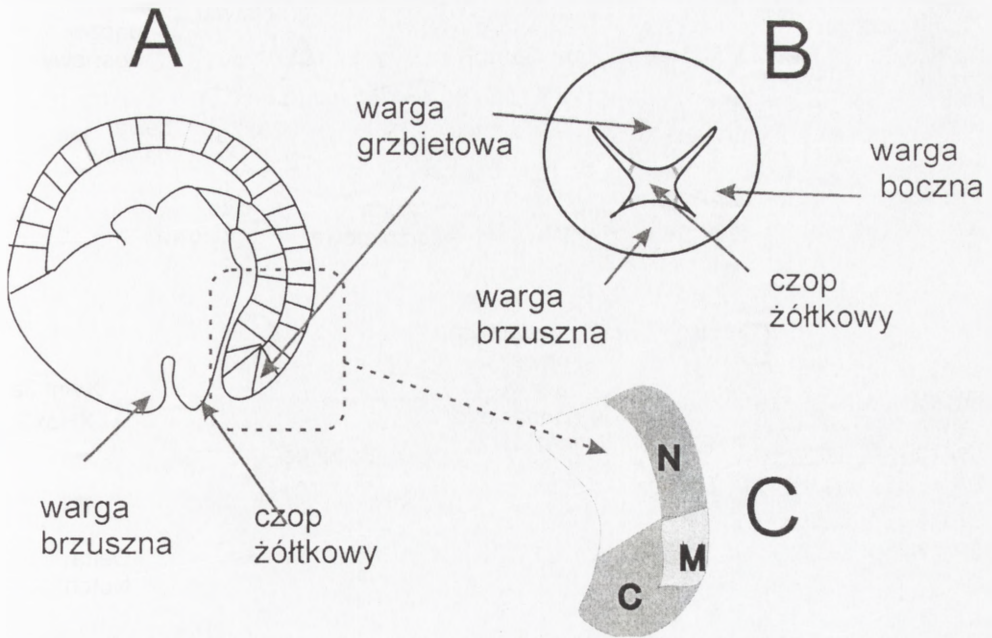
w czasie gastrulacji. Często ten etap rozwoju zarodka jest określany jako stadium pączka ogonowego. Z pączka ogonowego rozwijają się tylne narządy osiowe zarodka zwane niekiedy narządami ogonowymi. Są to rdzeń kręgowy i kręgi począwszy od tylnych kręgów lędźwiowych, przez krzyżowe do ostatniego kręgu ogonowego, odpowiadające im mięśnie osiowe oraz ogonowa część jelita. W miarę dołączania się coraz to nowych komórek do zawiązków tych narządów pączek ogonowy przemieszcza się ku tyłowi, pozostając jako tylna szczytowa czapeczka na koniuszku ogona.

Do niedawna pączek ogonowy nie budził zainteresowania, o czym świadczyć może fakt, że niektórzy autorzy znanych współczesnych podręczników embriologii nawet o tej strukturze nie wspominają [np. 6,12,26]. Na podstawie obserwacji morfologicznych uważano pączek ogonowy za niezróżnicowaną blastemę, z której bezpośrednio bez przejścia w listki zarodkowe rozwijają się narządy ogonowe. Pierwszy Pasteels, belgijski embriolog, w 1939 r. [59] zakwestionował ten pogląd sugerując, że pączek ogonowy może być organizatorem tylnej części zarodka i że zachodzą w nim przedłużone procesy gastrulacji. W ostatnich 10–15 lat przeprowadzono szereg badań eksperymentalnych, których wyniki potwierdziły te przypuszczenia i rozszerzyły nasze wiadomości o rozwoju i roli pączka ogonowego w rozwoju zarodków kręgowców.

MORFOLOGIA PĄCZKA OGONOWEGO

Rozwój pączka ogonowego najdokładniej prześledzono w rozwoju zarodków płazów bezogonowych, kury i myszy. U płazów pączek ogonowy uwidacznia się po zakończonej gastrulacji na tylnym końcu zarodka w momencie, kiedy płytka nerwowa na jej tylnym końcu jest jeszcze niezwinięta w cewę nerwową i łączy się ze struną grzbietową poprzez grupę komórek zwaną przegubem chordoneuralnym (ang. *chordoneural hinge*) (ryc. 1 i 2). Pod koniec gastrulacji tylny odcinek płytki nerwowej wraz z przegubem zostają okryte od zewnątrz przez zrosnięte wargi boczne blastoporu. Wargi te stopniowo powiększają się i zawężają światło blastoporu, który staje się wąską szparą i następnie zarasta. Pomiędzy zrosniętymi wargami bocznymi a przegubem chordoneuralnym pozostaje wąski kanał nerwowo-jelitowy. Kanał ten zostaje otoczony podnoszącymi się fałdami nerwowymi na końcu płytki nerwowej i z jednej strony łączy się z kanałem cewy nerwowej, a z drugiej strony z jelitem po cofnięciu się czopa żółtkowego. W wyniku tych zmian wypuklony na zewnątrz pączek ogonowy składa się z tylnej części cewy nerwowej (N), przyległej do niej grupy komórek pozostałości płytki nerwowej (M) i przegubu chordoneuralnego (C) oraz koniuszka pochodzącego z bocznych i brzusznej warg blastoporu. Na zewnątrz pączek ogonowy pokryty jest ektoderma powierzchnią [27] (ryc. 2B).

Rozwój pączka ogonowego u *Xenopus* prześledzono dzięki znalezieniu markerów dla poszczególnych części warg blastoporu. W wardze grzbietowej i jej pochodnych obszarach N i M ulega ekspresji gen czynnika transkrypcyjnego *Xnot*, podczas gdy w wargach bocznych i brzusznej i w powstałym z nich koniuszku zachodzi ekspresja



RYCINA 1. Tworzenie się pączka ogonowego u płazów; A – schematyczny przekrój gastruli w płaszczyźnie grzbietowo-brzusznej; B – schemat warg blastoporu, widok od strony brzusznej; C – warga grzbietowa, wycinek z ryc. A, zaznaczone domeny: N – przeznaczona na cewę nerwową, M – przeznaczona na mezenchymę oraz C – przegub chordo-neuralny

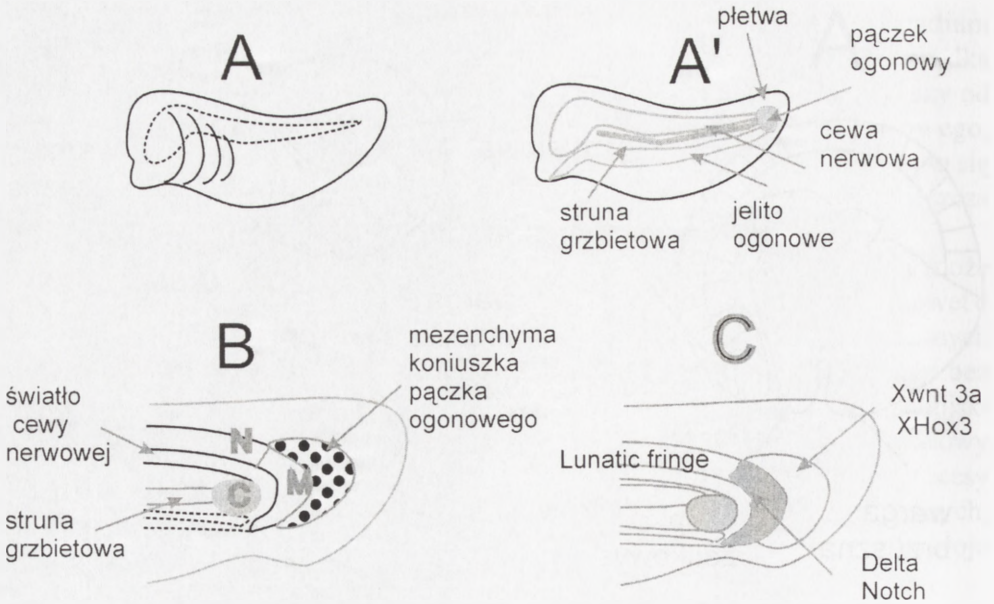
geny innego czynnika transkrypcyjnego *XBra*. W przegubie chordoneuralnym C ulegają ekspresji obydwa te geny *Xnot* i *Xbra* [71].

U owodniowców pączek ogonowy tworzy się, kiedy smuga pierwotna ulega skróceniu, węzeł pierwotny przesuwają doogonowo, a tylny neuropor zostaje zamknięty. Uformowany już pączek przemieszcza się w kierunku doogonowym, równocześnie dogłównie od niego pozostają nowo zorganizowane struktury ogonowe. W rezultacie tych przemian pączek ogonowy zajmuje mały obszar na końcu wytworzonego ogona zarodka (ryc. 3). W dalszym rozwoju zarodka pączek ogonowy zanika.

U ptaków pączek ogonowy rozpoczyna się tworzyć w stadium 13 somitów, w stadium 24–28 somitów jest w pełni rozwinięty [42], po czym stopniowo zanika [53,61]. U myszy pączek ogonowy staje się widoczny u zarodka w stadium około 20 somitów (8,5–9 dpc¹), zanika w stadium około 60 somitów (13,5 dpc) [45,69,74]. U zarodka człowieka pączek ogonowy widoczny jest po 3,5 tygodnia, zanika około 8. tygodnia rozwoju.

Pączek ogonowy owodniowców przylega ściśle do ogonowego końca cewy nerwowej i struny grzbietowej oraz do ślepo zakończonego końcowego odcinka jelita pierwotnego (ryc. 3B). Trzon jego stanowią wieloboczne komórki, powszechnie nazywane mezenchymatycznymi, nieróżniące się morfologicznie między sobą. Pączek

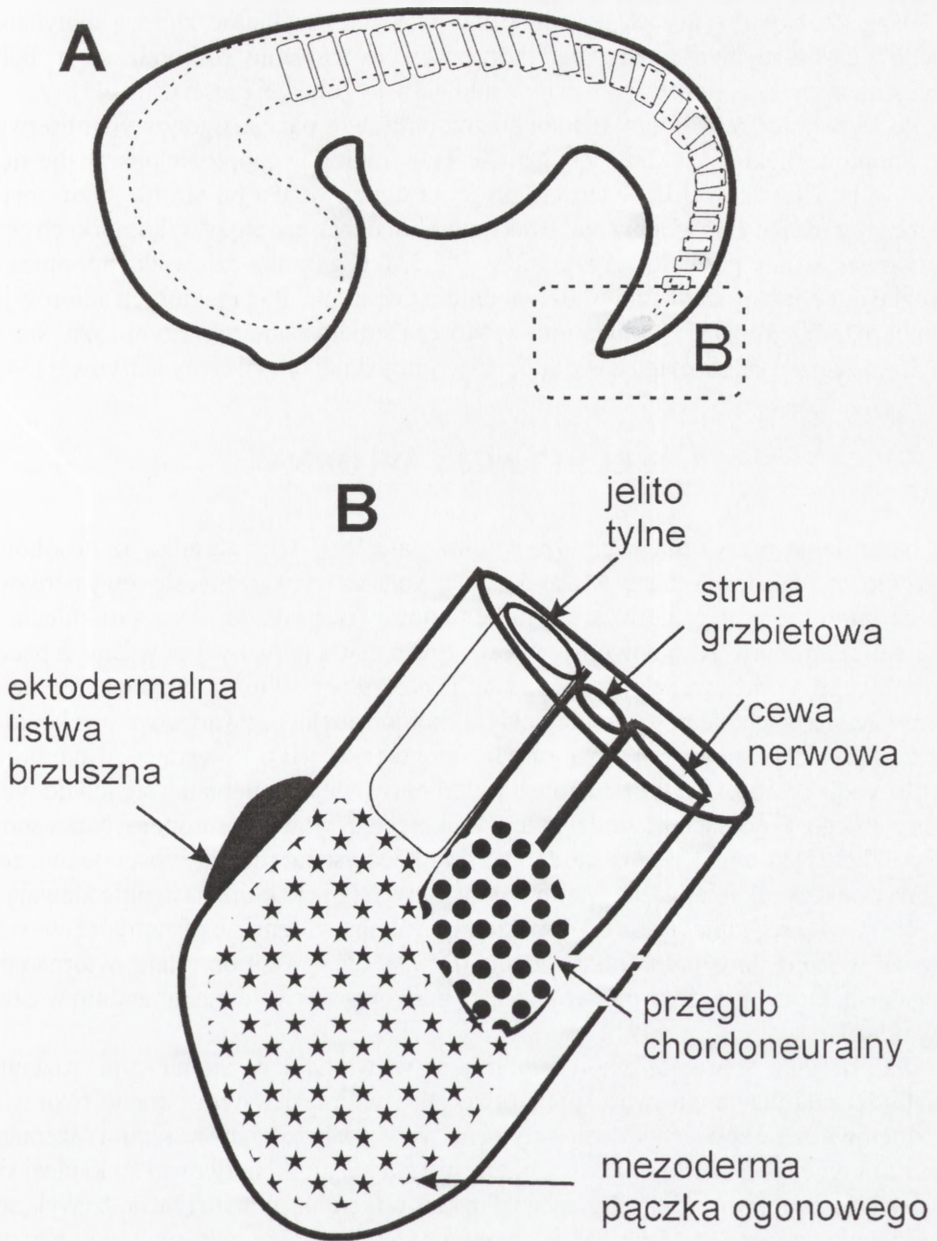
¹dpc – (ang. *day post coitum*) – dzień po zapłodnieniu, skrót przyjęty dla oznaczenia wieku zarodków ssaków.



RYCINA 2. Pęczek zarodkowy płaza: A – zarodek płaza w stadium pęczka ogonowego, A' – schematyczny przekrój zarodka A w płaszczyźnie grzbietowo-brzuszej, B – schemat pęczka ogonowego płaza, N – płytka nerwowa, M – mezenchyma, C – przegub chordo-neuralny; ryc. C – schemat rozmieszczenia białek Delta/Notch, Lunatic fringe, XWnt3a, Xhox3a w pęczku ogonowym płaza

ogonowy od zewnątrz pokryty jest ektodermą, która po stronie brzusznej wzdłuż osi długiej jest grubsza i tworzy przylegająca do mezenchymy listwę zwaną brzuszным grzebieniem ektodermalnym – VER (ang. *ventral ectodermal ridge*). Grzebień ten w miarę przesuwania się pęczka ogonowego ku tyłowi zanika [25]. Mimo iż nie ma różnic morfologicznych między komórkami mezenchymatycznymi, w pęczku ogonowym zarodków kury i myszy wyróżnić można rejony o odmiennym pochodzeniu i odmiennym przeznaczeniu, podobnie jak u *Xenopus*. Przedłużenie tylnego brzegu płytki nerwowej stanowi sznur rdzenny, z którego powstaje ogonowa (wtórna) cewa nerwowa. Pod nim znajduje się przedni rejon pęczka, nazywany także przegubem chordoneuralnym, który pochodzi z tylnej części węzła pierwotnego i zawiera komórki przeznaczone na wytworzenie ogonowej struny grzbietowej i płytki podłogowej w ogonowej części cewy nerwowej. W części tylnej pęczka ogonowego, pochodzącej ze smugi pierwotnej zlokalizowane są komórki progenitorowe somitów krzyżowych i ogonowych [13,14,15]. Część ta przez niektórych autorów jest określana jako mezenchyma końcowa lub koniuszkowa. U zarodka myszy ma ona nieco luźniejsze ułożenie komórek mezenchymatycznych niż w przegubie chordoneuralnym [13].

Do mezenchymy pęczka ogonowego przylega jelito ogonowe. U zarodka szczura tworzy się ono z komórek mezenchymatycznych w linii środkowej pęczka ogonowego. Komórki układają się tu w sznur, stają się polarne, wydłużone i tworzą rozetkowane struktury ze światłem w środku, które dają początek jednemu kanałowi [43].



RYCINA 3. A — zarodek myszy w stadium pączka ogonowego; B — schemat pączka ogonowego myszy, wyróżnione poszczególne domeny

W pączku ogonowym zachodzą ruchy inwaginacyjne i rozbieżne, które są kontynuacją ruchów gastrulacyjnych, stąd materiał przeznaczony na somity rozchodzi się na boki i uczestniczy przez apozycję we wzroście tułowiowo-ogonowej części ciała [45].

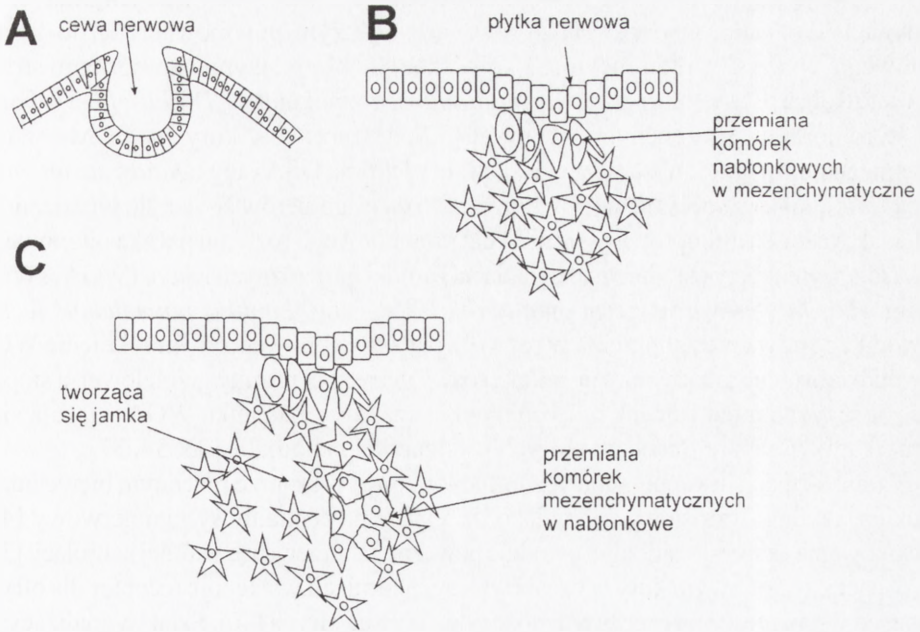
Po wytworzeniu się odpowiedniej liczby somitów w pączku ogonowym obserwuje się apoptozę niektórych komórek. Najwięcej komórek w apoptozie obserwuje się w pasmie linii środkowej degenerującego jelita ogonowego i po stronie brzusznej w mezenchymie pączka ogonowego. Brak natomiast oznak apoptozy w komórkach cewy nerwowej, struny grzbietowej i somitów [52,53]. U zarodka człowieka apoptoza w pączku ogonowym zachodzi w 4–6 tygodniu rozwoju. Według niektórych autorów jest to nekroza obejmująca masową i niewybiórczą śmierć komórek, czym różni się od zachodzącej w tym samym czasie apoptozy w przedniej części cewy nerwowej [54].

NEURULACJA WTÓRNA

Neurulacja pierwotna zachodzi wzdłuż całej osi A/P² zarodka aż do okolicy łądźwiowej. Jak powszechnie wiadomo, polega ona na wytwarzaniu się cewy nerwowej przez fałdowanie płyty nerwowej i fuzję fałdów. Trwa ona do czasu zamknięcia się tylnego neuroporu. Krzyżowa i ogonowa część cewy nerwowej powstaje z pączka ogonowego w drodze wtórnej neurulacji. Neurulacja wtórna rozpoczyna się od wytworzenia po grzbietowej stronie zawiasu chordoneuralnego zwartego pasma komórek mezenchymatycznych tzw. sznura rdzennego (ryc. 4B). Powstaje on na skutek proliferacji komórek na tylnym końcu płytki nerwowej i zagłębiania się ich do węzła pierwotnego. Proces ten zachodzi przed zamknięciem tylnego neuroporu. Nazwano go internalizacją komórek neuroektodermi [45]. Kiedy sznur rdzenny zostanie otoczony błoną podstawną, pojawia się w nim szereg małych jamek, które następnie zlewają się razem w większą jamę (ryc. 4C). Tworzenie się jamek w sznurze rdzennym i zlewanie się ich w jedną jamę nazwano kawitacją [60]. W ten sposób powstaje wtórna cewa nerwowa, która łączy się z pierwotną cewą nerwową wytworzoną uprzednio w czasie neurulacji.

Na początku neurulacji wtórnej płytka nerwowa nakłada się na sznur rdzenny i zachodzi neurulacja zarówno pierwotna, jak i wtórna i w tym okresie tworzy się grzbietowa część cewy nerwowej z płytki nerwowej, a brzuszna – ze sznura rdzennego. Po zamknięciu się neuroporu tylnego, gdy nie ma już płytki nerwowej stykającej się z pączkiem ogonowym, sznur rdzenny wydłuża się w kierunku tylnym i zachodzi wyłącznie neurulacja wtórna [14,15,63,64]. Ze sznura rdzennego różnicują się wtedy boczne i grzbietowe części wtórnej cewy nerwowej, podczas gdy płytka podłogowa wsuwa się do niej z przegubu chordoneuralnego. Równoległe z tworzeniem się sznura rdzennego przegub chordoneuralny przesuwają się ku tyłowi, na skutek proliferacji jego komórek, które przyłączają się grzbietowo do istniejącej już płytki podłogowej cewy nerwowej, a

² A/P (ang. *anterior-posterior*) – oś przednio-tylna zarodka.



RYCINA 4. Schemat neurulacji u zarodka owodniowca: A – nerulacja pierwotna przez podnoszenie się fałdów nerwowych i tworzenie rynienki nerwowej w płytce nerwowej; B – początek neurulacji wtórnej, tworzenie się sznura rdzennego przez wysuwanie się komórek z płytki nerwowej i transformację nabłonkowo-mezenchymatyczną; C – kawitacja, tj. tworzenie się jamek w sznurze rdzennym oraz transformacja mezenchymatyczno-nabłonkowa komórek

brzusznie do struny grzbietowej. Obydwie te struktury wydłużają się popychając pączek ogonowy ku tyłowi.

Przebieg neurulacji wtórnej u zarodków kury prześledzono w mikroskopie elektronowym. W sznurze rdzennym nieregularne komórki mezenchymatyczne z wypustkami przekształcają się w cylindryczne komórki nabłonkowe. Przemiana ta rozpoczyna się od komórek obwodowych. Na styku komórek cylindrycznych i środkowych mezenchymatycznych tworzą się liczne małe jamki, które następnie zlewają się w jedną podłużną jamę. Środkowe komórki mezenchymatyczne są stopniowo włączane w nabłonkową ścianę (interkalacja) [31,64].

W trakcie wtórnej neurulacji zachodzi przemiana komórek nabłonkowych neuroektodermi w komórki mezenchymatyczne, a w sznurze rdzennym z kolei przemiana komórek mezenchymatycznych w nabłonkowe (ryc. 4B,C). Transformacjom tym towarzyszą zmiany w składzie glikoprotein na powierzchni komórek oraz w macierzy pozakomórkowej – ECM (ang. *extracellular matrix*). Ważną rolę odgrywa w tym kadheryna N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule*) i być może inne glikoproteiny zawierające reszty kwasu sialowego. N-CAM występuje na powierzchni komórek sznura rdzennego, a potem komórek wtórnej cewy nerwowej [35]. Kiedy w sznurze rdzennym

wyodrębniają się nabłonkowe komórki obwodowe i centralne mezenchymatyczne, lektyna WGA (ang. *wheat germ agglutinin*), o dużym powinowactwie do kwasu sialowego, wiąże się preferencyjnie z komórkami nabłonkowymi i komórkami struny grzbietowej, a PNA (ang. *pea nut agglutinin*), rozpoznająca *D-Gal*,*b*[1-3]-*Gal N Ac*, z komórkami mezenchymatycznymi [33]. U zarodków kury w ECM sznura rdzennego pojawia się substancja wiążąca się z lektyną DSA (ang. *Datura stramonium agglutinin*), mającą specyficzne powinowactwo do oligomerów N-acetylo glukozaminy [31]. Jak ważne są glikoproteiny w ECM dla prawidłowego rozwoju pączka ogonowego, wskazują wyniki bezpośredniego działania na zarodki kury różnych lektyn (WGA, sWGA – ang. *succinilated wheat germ agglutinin*, LPL – ang. *Limulus polyphemus lectin*) powodujące poważne zaburzenia w rozwoju pączka ogonowego. Wstrzyknięcie WGA powodowało nienormalny rozwój wtórnej cewy nerwowej i struny grzbietowej, a stopień i częstość tych zmian zależne były od dawki i czasu jej działania. WGA wiązała się z komórkami w tych rejonach, w których występowały anomalie [33, 34, 37].

W transformacji mezenchymatyczno-nabłonkowej w sznurze rdzennym bierze udział midkina, czynnik wzrostowy znany jako działający na centralny system nerwowy [43]. Zahamowanie ekspresji midkiny powoduje poważne zaburzenia we wtórnej neurulacji [37].

W pączku ogonowym kury w czasie wtórnej neurulacji występuje receptor dla efryny Cek8, co wskazuje, że na proces ten może oddziaływać efryna [40]. Szlak sygnalizacyjny efryny działa w czasie rozwoju zarodkowego w tych miejscach, gdzie zachodzi zmiana kształtu i adhezji komórek, różnicowanie się tkanek i przestrzennej organizacji zarodka [39]. Efryna być może działa jako czynnik odpychający komórki od siebie [68].

SOMITOGENEZA W PĄCZKU Ogonowym

Pączek ogonowy, jak już zaznaczono wyżej, jest źródłem komórek dla wytworzenia mezodermy przyosiowej, a następnie somitów części ogonowej zarodka. Somity ogonowej części zarodka podobnie jak somity szyjne i tułowiowe dają początek kręgom, mięśniom i skórze właściwej części ogonowej zarodka.

Liczba wytworzonych nowych somitów ogonowych i powstałych z nich kręgów jest różna u poszczególnych gatunków kręgowców. Szczególnie dużo kręgów ogonowych jest u gadów. U ssaków liczba kręgów przedogonowych (szyjnych, piersiowych i lędźwiowych) jest ustabilizowana, natomiast liczba dalszych kręgów, zwłaszcza ogonowych jest różna i wynosić może od 3 do 47. Niektóre delfiny mają ponad 100 kręgów ogonowych. U człowieka 6 kręgów krzyżowych zrasta się w jedną kość, a następnym 3–4 nie w pełni wykształconych kręgów ogonowych tworzy kość ogonową. Mysz ma 7 kręgów szyjnych, 13 piersiowych, 6 lędźwiowych, 4 krzyżowe i około 30 ogonowych. U kury jest 5–6 wolnych kręgów ogonowych oraz 4 zrosnięte w kość ogonową.

Tworzenie się somitów z pączka ogonowego prześledzono u zarodków myszy i ptaków (kura i przepiórka). U tych zarodków równoległe z tworzeniem się wtórnej

cewy nerwowej komórki z grzbietowej części pączka ogonowego przemieszczają się ku przodowi i w kierunku brzuszonym (ingresja), a następnie na boki i ku przodowi³. Dołączają one do ogonowego końca płytki segmentalnej mezodermy przyosiowej, utworzonej już wcześniej w czasie gastrulacji. [45,75]. „Trasa”, po jakiej te komórki się przesuwały, odpowiada trasie prekursorów komórek somitowych w obrębie tułowia [9]. Po dołączeniu do płytki segmentalnej komórki te tworzą somitomery, a następnie somity.

Wyniki wielu doświadczeń ze znakowaniem komórek wskazują, że w rozwoju zarodków ptaków i myszy wyodrębnia się mała populacja komórek macierzystych dla mezodermy przyosiowej tułowia i ogona [70,73]. W smudze pierwotnej zarodka myszy w 7,5 dpc wylania się pula 100–150 komórek, która zatrzymuje się w smudze pierwotnej i pozostaje w stałej liczbie przez samoodnawianie. Z komórek tych w wyniku niesymetrycznych podziałów powstają komórki progenitorowe przyosiowej mezodermy zdolne do zasiedlenia każdego odcinka osi A/P [57]. Prawdopodobnie w rozwoju zarodkowym kręgowców są co najmniej dwa mechanizmy kierujące powstawaniem komórek macierzystych dla mezodermy przyosiowej. W pierwszym związanym z pierwotnym tworzeniem się ciała (ang. *primary body formation*, tj. odcinka głowowego i tułowiowego zarodka) komórki macierzyste dla mezodermy przyosiowej emigrują z epiblastu i gromadzą się w tylnej części smugi pierwotnej. Proces ten przebiega niezależnie od obecności białka sekrecyjnego Wnt5a (ang. *wingless integrated*) zaliczanego do białek segmentacyjnych. Macierzyste komórki dla mezodermy przyosiowej w tym etapie rozwoju zarodka są stale wzbogacane przez nowe komórki wpuklające się z epiblastu. We wtórnym rozwoju ciała (ang. *secondary body formation* – tworzenie się odcinka krzyżowo-ogonowego zarodka) komórki macierzyste dla mezodermy przyosiowej zlokalizowane są w pączku ogonowym w części pochodzącej ze smugi pierwotnej. Są więc bezpośrednimi potomkami komórek macierzystych mezodermalnych smugi pierwotnej. Zachowują zdolność do samoodnawiania i różnicowania się pod wpływem Wnt5a [74]. Są one jedynym źródłem dla komórek progenitorowych tworzących się somitów części ogonowej zarodka, gdyż w tym etapie rozwoju zarodka nie ma już ingresji komórek z epiblastu. Prawdopodobnie około 11,5 dpc w pączku ogonowym zarodka myszy wyczerpuje się pula komórek macierzystych dla mezodermy przyosiowej [69].

Tworzenie somitów w pączku ogonowym kończy się gwałtownie, kiedy określona liczba ich par, charakterystyczna dla danego gatunku, uformuje się wzdłuż osi A/P. Pozostaje jednak tylna część mezenchymy pączka ogonowego (ang. *terminal paraxial tailbud mesoderm*), która nie rozwija się w somity.

Nie wiadomo, co powoduje ustanie somitogenezy w pączku ogonowym. Może być wiele przyczyn, takich jak: wyczerpanie się puli komórek progenitorowych dla mezodermy przyosiowej, utrata potencji tworzenia somitów przez mezenchymę pączka ogonowego, zmiany w otoczeniu pączka ogonowego, które hamują różnicowanie się somitów, apoptoza komórek mezenchymatycznych. Koniec somitogenezy w pączku jest zaprogramowany. Pączek ogonowy kury, izolowany w różnych stadiach rozwoju, wszczepiony do kosmówki omoczniowej kontynuuje tworzenie somitów do liczby

³ Ruchy takie obserwowano w rozwoju pączka ogonowego ryby *Danio* i nazwano je *subductio*.

odpowiadającej ostatecznej liczbie somitów normalnego zarodka. Podobnie pączki ogonowe kury i myszy hodowane *in vitro* kończą somitogenezę, kiedy uzyskają określoną liczbę somitów [61]. Pozostała po zakończeniu somitogenezy niezróżnicowana mezenchyma pączka jest zorganizowana w somitomery, co uwidacznia się w mikroskopie elektronowym. Somitomery te jednak nie przekształcają się w somity ani *in situ*, ani w hodowli *in vitro*, ani wtedy gdy wszczepione zostają w ektotopowe miejsce, np. w pączku kończyny [8,46]. Wskazuje to że mezenchyma nie utraciła zdolności różnicowania się w somity i jest zdolna do zapoczątkowania somitogenezy. lecz że ten proces różnicowania został zatrzymany na etapie somitomerów. Może to być spowodowane zmianami w ECM mezenchymy, co prowadzi prawdopodobnie do nieodpowiedniej interakcji komórek z substancją międzykomórkową. Wykazano bowiem, że skład substratu ma znaczący wpływ na zdolność różnicowania się mezenchymy pączka ogonowego *in vitro* [69].

Rola śmierci komórek mezenchymatycznych w zatrzymaniu somitogenezy w pączku ogonowym nie jest jasna. U zarodków ptaków piknozę komórek obserwuje się w brzuszonym grzebieniu ektodermalnym i w jelicie ogonowym. Po zakończeniu somitogenezy wysoki poziom śmierci komórek jest ograniczony do koniuszka pączka ogonowego [52]. Niektórzy uważają, że zaprogramowana śmierć komórek jest znakiem stop dla tworzenia osi A/P zarodka na końcu ogonowym [53].

Rozwój i różnicowanie się mezenchymy pączka ogonowego wg niektórych zachodzi pod wpływem brzuszego grzebienia ektodermalnego (VER), który ma odpowiadać w swym działaniu szczytowemu grzebieniowi ektodermalnemu AER (ang. *apical ectodermal ridge*) na czubku pączka kończyny. W hodowli *in vitro* mezenchyma pączka ogonowego kury wymaga obecności ektodermy pączka dla przeżycia i wzrostu. VER jest również potrzebne dla ukierunkowania prekursorów komórek chrzęstnych biorących udział później w prawidłowej chondrogeniezie zawiązków kręgów ogona [35]. VER wszczepione w ektotopowe miejsce zarodka kury indukuje wydłużony wyrostek zawierający mezoderme przyosiową [49].

POTENCJE ROZWOJOWE KOMÓREK PĄCZKA OGONOWEGO

Pączek ogonowy myszy wszczepiony w całości pod torebkę nerki wytwarza różne tkanki, w tym głównie pochodne somitów: mięśnie, chrząstkę, kość [66]. Podobnie pączek ogonowy przepiórki wszczepiony do kosmówki omoczniowej zarodka kury różnicuje się w różnego rodzaju komórki [57]. W izolowanym pączku ogonowym kury hodowanym *in vitro* powstają zróżnicowane komórki, takie jak: neurony, mioblasty, chondrocyty [32]. Wskazuje to, że w pączku ogonowym komórki są już zdeterminowane lub co najmniej ukierunkowane w określony typ różnicowania i rozwoju. Jest to zgodne z wyżej omówionym stwierdzeniem, że w pączku ogonowym można wyróżnić rejony o odmiennym pochodzeniu i odmiennym przeznaczeniu rozwojowym. Jednak wyniki

innych doświadczeń wskazują, że w pączku ogonowym są także komórki pluripotenne, zdolne zależnie od warunków, w jakich się znajdują, różnicować się w wiele typów komórek. Jeżeli bowiem małe wycinki pączka ogonowego, wyznakowane, na różny sposób wszczepiono do smugi pierwotnej młodszych zarodków, to po 24 godz. hodowli znajdowano u biorców wyznakowane komórki w tworzących się narządach. Komórki te były zróżnicowane zgodnie z kierunkiem rozwoju zasiedlonego narządu. Wszczepione znakowane komórki kolonizowały narządy, które powstawały już po ich wszczepieniu, głównie tylną część mezodermy przyosiowej (płytki segmentalnej) i nowopowstałe somity, ale także mezoderme boczną, strunę grzbietową, cewę nerwową i endoderme jelita tylnego [70]. W ostatnich latach Cambray i Wilson [13] wykonali podobne, lecz precyzyjniejsze doświadczenia, przeszczepiając pojedyncze wyznakowane komórki oddzielnie z przegubu chordoneuralnego i końcowej mezenchymy pączka ogonowego. Wykazali oni, że większość komórek pączka ogonowego ma ograniczone potencje rozwojowe, nie inkorporuje się do struktur osiowych po wszczepieniu do smugi pierwotnej młodszeo zarodka. Jedyne komórki z grzbietowej części przegubu chordoneuralnego są pluripotenne, inkorporują się do somitów utworzonych po ich przeszczepieniu do młodszeo zarodka. Nie tracą potencji rozwojowych po 3-krotnym przeszczepieniu do zarodków biorców. Mają one również zdolność samoodnawiania. Są zatem komórkami macierzystymi dla pączka ogonowego i struktur z niego rozwijających się. Są one pochodnymi komórek macierzystych, jakie we wcześniejszej fazie rozwoju zlokalizowane były w węźle pierwotnym zarodka myszy i kury [14,15]. Pluripotenne komórki znajdują się także w przegubie chordoneuralnym zarodka *Xenopus* [21].

Komórki macierzyste z grzbietowej części przegubu chordoneuralnego przesuwają się do jego części brzusznej i różnicują się w strunę grzbietową, a te, które przesuną się ku tyłowi do mezenchymy końcowej, zostają ukierunkowane w komórki mezodermy i jej pochodne [13].

MECHANIZMY MOLEKULARNE KIERUJĄCE ROZWOJEM I RÓŻNICOWANIEM SIĘ PĄCZKA OGONOWEGO

Badania nad procesami molekularnymi zachodzącymi w pączku ogonowym są nieliczne. Informacje o ekspresji genów w jego obrębie pochodzą głównie z interpretacji zaburzeń rozwoju (malformacji) części ogonowych zarodków myszy i kury, a niektóre dane z oznaczeń ekspresji poszczególnych genów w całych zarodkach, przeprowadzonych przy okazji rozwiązywania różnych innych problemów rozwoju zarodków. Z tych jak narazie dostępnych danych trudno jest wyciągnąć szersze uogólniające wnioski.

We wczesnym etapie rozwoju pączka ogonowego, morfologicznie jeszcze nieodróżnicowanego, część przednia pochodząca z węzła pierwotnego i obejmująca przegub chordoneuralny zachowuje ekspresję markerów węzła. U zarodków kur markerem są produkty genu *Gnot-1*⁴ [45]. W przyszłych neuralnych komórkach

⁴ Gen *Gnot* koduje czynnik transkrypcyjny z homeodomeną, homologiczny z *Xnot* u *Xenopus*.

przegubu nadal jest obecne białko L5, marker komórek epiblastu⁵ kompetentnych na indukcję nerwową, a w przyszłych komórkach struny grzbietowej wykazuje się ekspresję genów *brachyury* - *Ch-T*⁶. W części tylnej pączka ogonowego, pochodzącej ze smugi pierwotnej, zachodzi ekspresja genów *Ch-Tbx6*, (blisko związanych z *Ch-T*) charakterystycznych dla tworzącej się mezodermy przyosiowej. W pełni uformowanym pączku ogonowym wykazano ekspresję genów *brachyury* *Ch-T* i *Ch-tbx6* [44], *cdx-1*⁷ [3], *Ccdx-B* [54] *evx-1*⁸, *sna*, *fgf8*⁹ [18] i *fgf-4* [65], *wnt-3a*¹⁰ i *bmp-11*¹¹ [56,60], *sprouty2*¹² [6] oraz obecność retinoidów. Podobna ekspresja genów zachodzi w pączku ogonowym myszy. Wykrywa się w nim ekspresję *fgf8*, *fgf9*, *gdf11*, *wnt3a*, *wnt5a*, *wnt5b*, *hoxb1*, *hoxd11*, *hoxa13*, *dl2*¹³, *dl3*, *Notch 1*, *brachyury-T*, *evx1*, *tbx6*¹⁴, *lefty*¹⁵ [11], *fgfr1*¹⁶ *RARgamma*¹⁷ [28,55,56,60]. Jak wynika z przytoczonych danych, znamy tylko kilka czynników

⁵ Zarodki ptaków i ssaków po zakończeniu bruzdkowania, a przed rozpoczęciem gastrulacji mają postać tarczki złożonej z dwóch warstw epiblastu i hypoblastu. Z epiblastu powstaje właściwy zarodek, z hypoblastu tworzą się błony płodowe.

⁶ Gen *brachyury* - *Ch-T* koduje czynnik transkrypcyjny u kury, u myszy homologiczny gen to *brachyury T*, w 50% homologiczny z *Xbra* u *Xenopus*.

⁷Cztery paralogiczne geny myszy: *cdx1*, *cdx2*, *cdx3* i *cdx sq* odpowiednikami genu *cad* (ang. *caudal*) u *Drosophila*; geny *cdx* są związane z regulacją ekspresji kodu Hox, u kury odpowiadają im geny *c-CdxA* i *c-CdxB* nazywane dawniej *c-Hox-cad*.

⁸ Gen *evx-1* (ang. *evenskipped -1*) homologiczny z genem *Xhox-3* u *Xenopus*, koduje czynnik transkrypcyjny.

⁹ Rodzina białek sekrecyjnych FGF (ang. *Fibroblast Growth Factor*) kodowanych przez kilkanaście genów *fgf*; czynniki FGF odgrywają ważną rolę w rozwoju zarodkowym, na ogół pobudzają proliferację komórek.

¹⁰ Rodzina białek Wnt (ang. *wingless integrated*) homologicznych z białkami segmentacyjnymi WG (ang. *Wingless*) u *Drosophila*; U kręgowców odkryto 17 odrębnych genów *wnt* kodujących te glikoproteiny. Białka Wnt występują w dwóch postaciach, jedne są wolne sekrecyjne dyfundujące w substancji międzykomórkowej, drugie związane są z błoną komórkową. Transdukcja sygnału Wnt w komórce zachodzi przy udziale kateniny i kinazy GSK3 (ang. *glycogen synthase kinase*) lub przy udziale fosfoinozytolu jak np. *Wnt5a*. Przepuszczalnym receptorem dla WNT jest białko Frizzled - Frz, które ma dwie postacie: jedną związaną z błoną komórkową i drugą wolną rozpuszczalną, które może się wiązać z WNT w przestrzeniach międzykomórkowych i przez to zapobiega jego wiązaniu się z komórką docelową.

¹¹ BMP (ang. *bone morphogenetic protein*) - morfogenetyczne białko kości, sekrecyjne białko, czynnik wzrostowy z dużej rodziny białek TGFβ (ang. *Transforming Growth Factorβ*); BMP-11 nazywane także GDF11 (ang. *growth / differentiation factor*) czynnikiem różnicująco-wzrostowym.

¹² Białko sprouty 2 jest modulatorem śródkomórkowym receptorów tyrozynowej kinazy dla FGF i EGF i antagonistą kinazy ras/MAP, w pączku ogonowym związany jest z ekspresją FGF.

¹³ Geny *Delta* - *dl* kodują błonowe białko sygnalizacyjne wiążące się z błonowym receptorem Notch. System sygnalizacyjny Delta/Notch odgrywa ważną rolę w wielu procesach zachodzących w czasie różnicowania się komórek zarodkowych, w tym w tak zwanej inhibicji bocznej powodującej odmienne zróżnicowanie dwóch sąsiadujących ze sobą komórek potomnych, patrz [44].

¹⁴ *Tbx* białko z rodziny Brachyury -T, występujące w wielu izoformach w rozwoju myszy, szczególnie odgrywa w rozwoju kończyn.

¹⁵ Białka *lefty 1* i *lefty 2*; należą do rodziny czynników wzrostowych TGFβ, biorą udział w determinacji prawej i lewej strony zarodka; *Lefty 1* działa jako antagonist białka nodal; ekspresja *lefty* może być indukowana przez kwas retinowy.

¹⁶ FGFR1 receptor błonowy dla czynników FGF.

¹⁷ RAR γ receptor jądrowy dla kwasu retinowego.

sygnalizacyjnych oraz czynników transkrypcyjnych, które są aktywne w czasie wzrostu i różnicowania się pączka ogonowego. Na obecnym etapie wiedzy można jedynie przypuszczać jaką pełnią rolę, ale jest jeszcze daleko do ustalania powiązań między nimi.

Czynniki wzrostowe z rodziny FGF, wiążące się z receptorami FGFR1, jak się sądzi, wpływają na proliferację mezenchymatycznych komórek pączka ogonowego. Wskazuje na to także obserwacja mutantów myszy *fgf3* null, u których nieprawidłowo przebiega rozwój pochodnych mezodermy przyosiowej, skutkiem czego mają one krótki skrócony ogon oraz zmiany w kręgosłupie [51,55]. W czasie rozwoju zarodka FGF8 jest syntetyzowany na rosnącym tylnym końcu zarodka i stopniowo degradowany w nowowytworzonych tkankach, stąd uważa się, że czynnik ten jest związany z różnicowaniem się tkanek i wydłużaniem zarodka ku tyłowi [23].

GDF11 (zwane także BMP11) jest czynnikiem sekrecyjnym działającym w wielu procesach rozwojowych. Między innymi gra rolę w ustalaniu formy szkieletu, reguluje bowiem tożsamość (identyczność) pozycyjną struktur ułożonych wzdłuż osi A/P, tj. nadaje każdej strukturze cechy właściwe dla miejsca jej położenia na tej osi. U myszy mutantów *gdf* null zachodzi przednia homeotyczna transformacja kręgów. Wykazują one cechy kręgów zlokalizowanych bardziej dogłowowo, niż wskazuje na to ich położenie. GDF11 prawdopodobnie reguluje wzór ekspresji genów *hox* [56,60].

Jak się wydaje, ważną rolę w rozwoju pączka ogonowego, a zwłaszcza jego mezodermy odgrywają czynniki wzrostowe z rodziny Wnt: Wnt3a i Wnt5a. Białko Wnt5a jest produkowane w brzusznej grzebieniu ektodermalnym (VER). Wydzielane z tej części pączka ogonowego działa na proliferację komórek progenitorowych mezenchymatycznych i podtrzymuje ich przeżywanie [74]. Obecność i aktywność Wnt3a jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu somitogenezy w pączku [29], o czym już wspomniano wyżej. Myszy mutanty *wnt5a* null mają skrócony ogon na skutek redukcji liczby kręgów (do 9) i zmniejszenia ich wielkości [74], a mutanty *wnt3a* null nie mają kręgów ogonowych [29,41]. U mutantów tych zaburzona jest somitogeneza, powstaje znacznie mniej komórek progenitorowych mezodermy przyosiowej w smudze pierwotnej i mniej ich przechodzi następnie do pączka ogonowego [74]. Wnt3a decyduje o tożsamości pozycyjnej kręgów [41]. Potwierdzeniem ważnej roli białek Wnt w rozwoju pączka ogonowego jest wynik eksperymentu, w którym zahamowano ich działanie. Śród-maciczne podanie ciężarnym myszom rozpuszczalnego białka Frizzled, antagonisty Wnt, spowodowało u zarodków wstrzymanie rozwoju somitów pączka ogonowego. Prawdopodobnie Frizzled hamuje oddziaływanie Wnt5a na komórki progenitorowe już zdeterminowane w kierunku mezodermy przyosiowej [10]. Mutanty *wnt* null, które nie mają wykształconych kręgów ogonowych, mają zredukowaną ekspresję *cdx1* w pączku ogonowym [29,41,74].

Geny *cdx1* i *cdx2* myszy i *Ccdxa* i *Ccdxb* kury są homologiczne z genem *caudal* u *Drosophila* odpowiedzialnym za rozwój ostatniego segmentu odwłokowego (analia). U kręgowców są one związane z rozwojem somitów i tworzeniem się kręgów. Biorą udział w ustalaniu tożsamości pozycjonalnej poszczególnych somitów wzdłuż osi A/P. Regulują, jak się sądzi, transkrypcję genów Hox. W czasie gastrulacji u zarodków

myszki ekspresja *cdx* pojawia się w przedniej części mezodermy przyosiowej i w miarę rozwoju zarodka cofa się ku tyłowi, po czym pozostaje wyłącznie w pączku ogonowym. W pochodnych pączka geny *cdx* ulegają ekspresji tylko w tylnej części wtórnej cewy nerwowej i w tylnych sklerotomach. Prawdopodobnie CDX bierze udział w ukierunkowywaniu komórek progenitorowych somitowych i wpływa na ich przeżywanie w pączku ogonowym. Noworodki mutanty *cdx1* i *cdx2* null wykazują brak wykształconych struktur ogonowych. Geny *cdx* przypuszczalnie działają inaczej w czasie rozwoju przednich i tylnych struktur osiowych zarodka [3]. Podobnie zachowują się geny *Ccda1* i *Ccda2* w rozwoju zarodka kury [54]. Przypuszcza się, że geny *cdx* biorą udział w regulacji i integracji mechanizmów kontrolujących wydłużanie się zarodka wzdłuż osi A/P [18].

Zmiany w prawidłowym rozwoju zarodków podobne jak u myszy mutantów *cdx* null obserwuje się u mutantów z brakiem *wnt3a*, *brachyury* *T*, *left1/tf1* oraz *fgfr1*, co wskazuje, że wszystkie te czynniki sygnalizacyjne i transkrypcyjne uczestniczą w wytwarzaniu tylnej części zarodka, utrzymując proliferację i przeżywanie komórek pączka ogonowego [3].

Białko Evx-1 gra rolę w segmentacji ciała i neurogenezie. Jest ono wysoce konserwatywne, występuje u wszystkich przebadanych pod tym kątem kręgowców [5].

Czynnik Tbx6 potrzebny jest dla ukierunkowania komórek mezodermalnych w somitowe [7]. Komórki takie, u myszy pozbawionych Tbx6, po wyjściu ze smugi pierwotnej mają specyficzne ograniczenia rozwojowe, rozwijają się tylko w przednie somity, natomiast nie rozwijają się w somity ogonowe [17].

Wykrywana w pączku ogonowym myszy ekspresja genów *Delta: dl2* i *dl3* wskazuje, że w jego rozwoju bierze udział także sygnalizacja Delta-Notch. Sygnalizacja ta odgrywa ważną rolę w wielu procesach rozwojowych, między innymi w wyodrębnianiu się neuronów z niezróżnicowanych komórek neuroektodermy oraz tworzeniu się somitów. [patrz 47]. Sygnalizacja Delta-Notch bierze udział w rozwoju pączka ogonowego *Xenopus*. Beck i Slack [7] zaproponowali następujący model jej działania u tych zwierząt. We wczesnym stadium rozwoju pączka w wargach bocznych blastoporu pojawia się ekspresja genu *lfng* kodującego białko sekrecyjne LFNG (ang. *lunatic fringe*), które wzmacnia odpowiedź komórki na działanie liganda Delta. Następnie zarówno *Delta*, jak i *Notch* ulegają ekspresji w rejonie końcowym M, który daje początek mezenchymie. Ekspresja ta jest stymulowana przez LFNG, wytwarzany w grzbietowej części końca wtórnej cewy nerwowej stykającej się z odcinkiem M. Równocześnie w samym koniuszku pączka zachodzi ekspresja *Xwnt3a* i *Xhox3* (homologiczny z *evx*) (ryc. 2C). Białko XWnt3a decyduje o osi grzbietowo-brzuszej, a białko XHox3 jest potrzebne do wzrostu pączka i jego pochodnych.

Sygnalizacja Delta-Notch w czasie rozwoju pączka ogonowego może pełnić wieloraką rolę; może brać udział w różnicowaniu się neuronów i komórek we wtórnej cewie nerwowej, może brać udział w tworzeniu i rozdzielaniu się somitów, może także powodować odmienne różnicowanie się sąsiednich komórek, co przejawia się w mozaikowości komórek progenitorowych.

Geny *Hox* u ssaków i ptaków uczestniczą w segmentacji i różnicowaniu się kręgosłupa. Ulegają ekspresji w cewie nerwowej, w mezodermie przyosiowej i somitach zgodnie z zasadą kolinearności przestrzennej i czasowej. Im dalej od głowy, a bliżej ogona, tym więcej grup paralogowych¹⁸ położonych bliżej końca 5' genów *Hox* ulega ekspresji. Przednia granica ekspresji danej grupy paralogowej wyznacza równocześnie przednią granicę danego odcinka osi A/P. U myszy przednia granica ekspresji genów *hoxd-10* sięga pierwszych somitów lędźwiowych, *hoxd-11* – krzyżowych, a *hoxd-12* – ogonowych. U kury wytwarza się więcej somitów lędźwiowych, które w dalszym rozwoju wraz z somitami krzyżowymi formują kość lędźwiowo-krzyżową [*os lumbosacrale*], w związku z czym w somitach lędźwiowych zachodzi już ekspresja *hoxa10*, *hoxc-10* i *hoxd10*, a w somitach krzyżowych *hoxa-11*, *hoxc-11* i *hoxd-11*. W somitach ogonowych ulegają ekspresji geny *hox* wszystkich grup paralogowych, w czym pojawia się ekspresja genów *hoxd-12*, *hoxa-13* i *hoxd-13* [11]. Jaką rolę pełnią poszczególne geny *Hox* w rozwoju pączka ogonowego, niewiadomo. Czy działają one synergicznie, czy też każda grupa paralogowa ma odrębną funkcję?

Myszy mutanty *hoxb13* null mają przerost wszystkich struktur pochodzących z pączka ogonowego, w tym cewy nerwowej, ogonowych zwojów kręgowych kręgów ogonowych, co spowodowane jest wzrostem proliferacji komórek i zatrzymaniem apoptozy. Stąd można wnioskować, że *hoxb13* działa jako inhibitor mitoz i stymulator apoptozy we wtórnej cewie nerwowej i jako represor wzrostu kręgów ogonowych. *Hoxb13* jest położony najbliżej końca 5' w swoim zespole [24].

Ekspresja genów *hox* jest zależna między innymi od poziomu kwasu retinowego – RA (ang. *retinoic acid*) w komórkach i otaczających je tkankach. Zarodki kręgowców już we wczesnych stadiach rozwoju syntetyzują RA. Obecność jego wykazano w komórkach zarówno neuroektodermi, jak i mezodermi. U zarodków ptaków i zarodków myszy najwięcej RA zawiera cewa nerwowa, nieco mniej somity i rozwijające się oko, pączek ogonowy i różnicujące się narządy nosowo-czołowe, jeszcze mniej w pączki kończyn i łuki skrzelowe¹⁹.

Poziom RA i retinoidów w komórce zwierzęcej jest kontrolowany przez całą serię zabezpieczeń regulacyjnych. W komórce kwas retinowy jest syntetyzowany przy udziale dehydrogenazy retinaldehydowej RALDH, a katabolizowany przy udziale cytochromów P 450 - CYP450 oznaczonych jako CYP26A i CYP26B. Śródkomórkowe białko CRABP (ang. *cellular RA binding protein*) wiąże retinoidy, a w razie zapotrzebowania uwalniania je i w ten sposób reguluje ich stężenie w komórce. Endogenny RA wyprodukowany przy udziale RALDH nie wpływa na syntezę CYP26 w danej komórce, natomiast egzogenny RA reguluje poziom tych enzymów na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Stymuluje syntezę CYP26 i hamuje syntezę RALDH. W tkankach

¹⁸ Geny paralogowe: geny o bardzo zbliżonej sekwencji DNA i kodujące identyczne lub bardzo zbliżone do siebie białka; powstały prawdopodobnie przez duplikację jednego genu w czasie ewolucji.

¹⁹ Od dawna wiadomo, że kwas retinowy i jego pochodne biologicznie czynne – retinoidy mają wpływ na rozwój układu nerwowego, zwłaszcza mózgowia i że zmiany w prawidłowym stężeniu tych czynników powodują poważne zaburzenia rozwojowe i malformacje zarówno w rozwoju człowieka, ssaków, jak i ptaków (duża literatura na ten temat, np [19]).

zarodkowych na ogół CYP26 i RALDH nie występują równocześnie w tej samej komórce, lecz w sąsiednich komórkach lub odmiennych tkankach [22]. RA i retinoidy są uważane za morfogeny, bowiem efekt ich działania zależy od wartości progowych, stężenia i czasu działania. Uwalniane z komórek zarodka rozchodzą się w macierzy substancji międzykomórkowej (ECM). Działają na komórki, kompetentne na ich odbiór, poprzez specyficzne receptory jądrowe RAR i RXR. Przypuszcza się ponadto, że istnieje receptor błonowy ułatwiający przenikanie retinoidów do komórki. Retinoidy są szybko przez te komórki metabolizowane [50]. Ścisła regulacja rozmieszczenia retinoidów w normalnej morfogenezie jest ważna dla prawidłowego rozwoju zarodka. Cyp26A1 i Cyp26B1 utrzymując odpowiedni poziom RA w tkankach i komórkach i chronią je przed niewłaściwym działaniem egzogennych retinoidów [1].

Komórki pączka ogonowego zawierają RA. Syntetyzują go i wydzielają też *in vitro* [50]. Można sądzić, że w czasie normalnego rozwoju pączka ogonowego poziom RA w jego komórkach jest ściśle regulowany. W pączku ogonowym zarodków zarówno myszy, jak i kury aktywny jest Cyp26A1, a nie ma aktywnego Cyp26 B1 [48]. Aktywny CYP26A1 chroni pączek ogonowy przed działaniem RA produkowanego w przyległej mezodermie tułowiowej, w której aktywna jest RALDH [2]. U letalnych mutantów myszy z brakiem Cyp26A1 pączek ogonowy rozwija się i różnicuje nieprawidłowo, a płody wykazują poważne zaburzenia tylnych okolic ciała, takie jak: *spina bifida* czy zanik ogona (*caudal agenesis*). U tych mutantów wykazano w pączku ogonowym wiązanie ektotopowych retinoidów przez RAR γ oraz zanik ekspresji *wnt3a* i *fgf8*. Wycięcie genu RAR γ przywraca u mutantów *Cyp26A1* null ekspresję *wnt3a* i *fgf8* oraz rozwój części ogonowych i żywotność zarodka [1,2].

Od RA zależna jest ekspresja genu *midkiny*, wspomnianego wyżej czynnika wzrostowego biorącego udział w przejściu komórek mezenchymatycznych w nabłonkowe. Nadmiar RA powoduje zahamowanie tej ekspresji, natomiast niedobór RA nie ma na nią wpływu [30,37].

Wpływ egzogennych retinoidów na rozwój pączka ogonowego wykazano u kury i myszy. Zarodkom kur wstrzykiwano RA bezpośrednio pod tarczkę zarodkową, a ciężarnym samicom myszy podawano RA, który jest transportowany przez łożysko do zarodków. W innych doświadczeniach syntezę RA blokowano Citralem. Wykazano, że zarówno nadmiar, jak i niedobór RA powoduje zaburzenia w rozwoju wtórnej cewy nerwowej. Przy nadmiarze RA zamiast jednej cewy nerwowej w pączku ogonowym tworzą się liczne cewy nerwowe dodatkowe i dochodzi do połączenia struny grzbietowej z cewą nerwową oraz jelitem tylnym. Nasilenie się tych zmian zależy od dozy podanego RA, od czasu jego działania i od stadium rozwoju zarodka, w którym go podano [32,54,62]. Podanie RA nie miało wpływu na obecność receptorów RAR γ w komórkach mezenchymatycznych [66].

Podobnie, jak pod nadmiarem działania RA, ektotopowe, dodatkowe cewy nerwowe powstają w pączkach ogonowym zarodków myszy, pod wpływem lektyn wiążących reszty kwasu sialowego w składnikach ECM [36] oraz u mutantów pozbawionych genów *fgfr1* [55], *wnt3a* [74], *tbx6* [17], *left* lub *tef* [55]. Dodatkowe cewy nerwowe tworzą się z zagęszczeń mezenchymy rozmieszczonych jak wysepki w pączku

ogonowym. W zagęszczeniach tych zanika ekspresja genów *wnt3*, *tbx6* i *Notch1* [66]. Dodatkowe cewy nerwowe wykazują takie same cechy molekularne jak pierwotne cewy nerwowe, to jest ekspresję *pax3* w płycie sufitowej i *shh* w płycie podłogowej. W dalszym rozwoju różnicują się w nich neurony ruchowe i tworzą zwoje kręgowce [55].

Mechanizm powstawania dodatkowych cew nerwowych przynajmniej częściowo wyjaśnili Nait-Oumesmar i współautorzy [55]. Wyprodukowali oni podwójnie transgeniczne normalnie rozwijające się i żywotne myszy, którym wprowadzono gen *gcm1* sprzężony ze wzmacniaczem promotora genu *hoxa7*. Białko Gcm (ang. *Glial cell missing*) jest czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje różnicowanie się progenitorów neuralnych w komórki nerwowe lub glejowe zarówno u kręgowców, jak i u *Drosophila*. W rozwoju zarodków dzikich szczepów myszy ekspresja *gcm1* występuje w centralnym systemie nerwowym oraz w niektórych innych narządach, nie zachodzi jednak w pączku ogonowym. U zarodków podwójnie transgenicznych ekspresja *gcm1* jest ektopowa i ograniczona do określonego etapu jego rozwoju, jest bowiem zależna od wszczepionego elementu promotora *hoxa*. Występuje tylko przez określony czas od 9 do 13 dpc, tj. od okresu poprzedzającego wtórna neurulację do początku zaniku pączka ogonowego i jest ograniczona do cewy nerwowej i mezodermy przyosiowej tylnej okolicy zarodka. Przednia granica ekspresji *gcm1* w 9 dpc sięga 32.–34. somitu, tj. poziomu przyszłego 3. kręgu krzyżowego. W miarę rozwoju zarodka granica ta cofa się i w końcu wykrywana jest tylko na samym koniuszku pączka ogonowego. U wszystkich tych podwójnych transgenów rozwijały się dodatkowe cewy nerwowe, jedne związane z pierwotną cewą nerwową na jej końcu tylnym i drugie w pączku ogonowym wolne, niepołączone z cewą nerwową. U około 25% osobników transgenicznych występowało także rozdwojenie rdzenia kręgowego (*spina bifida*). Zmiana kierunku różnicowania się progenitorów mezodermy przyosiowej w progenitory komórek nerwowych u podwójnych transgenów nie odbywała się kosztem komórek mezenchymatycznych, gdyż mezoderma przyosiowa i somity ogonowe rozwijały się normalnie. Gcm1 zmieniło kierunek rozwoju tylko niektórych komórek mezenchymatycznych, a także stymulowało proliferację komórek o zmienionym kierunku rozwoju. Potwierdza to obserwacja, że pączek ogonowy zarodków podwójnych transgenów jest znacznie większy niż zarodków dzikich szczepów.

Można więc za Nait-Oumesmar i współautorami [55] pokusić się o następującą interpretację powstawania dodatkowych cew nerwowych w pączku ogonowym. Komórki mezenchymatyczne pączka ogonowego są normalnie ukierunkowane na rozwój w mezoderme przyosiową i jej pochodne, w tym ukierunkowaniu biorą udział Wnt3a, Tbx6, FGF8, kwas retinowy i zapewne i inne czynniki, które działają synchronicznie i kompleksowo. Brak lub nadmiar jednego z tych czynników może zatrzymać to ukierunkowanie i skierować komórki na szlak rozwoju neuralnego. Ukierunkowanie więc komórek macierzystych w pączku ogonowym na szlak różnicowania mezodermalnego zależy od działania na nie całego zespołu czynników mezodermizujących, brak jednego z nich powoduje wejście komórek macierzystych na szlak rozwoju nerwowego. Od niedawna jest wiadomo, że w czasie gastrulacji u kręgowców rozpoczęcie szlaku rozwoju neuralnego opiera się na specyficznym sposobie indukcji,

polegającym na blokowaniu działania czynnika działającego na ektodermę (indukcja przez brak, ang. *default induction*). Komórki ektodermny mają właściwości autonomicznego różnicowania się w komórki nerwowe, jednak dzięki obecności w nich czynnika wzrostowego BMP różnicują się one w epidermę. Z organizatora Spemanna u płazów i węzła pierwotnego u owodniowców wydzielane są substancje antagonistyczne do BMP. Są to białka sekrecyjne: chordyna, follistatyna i noggin, które w przestrzeniach międzykomórkowych wiążą się z BMP oraz z jego receptorami, nie dopuszczając do działania tego białka. Pozbawione w ten sposób wpływu BMP komórki ektodermalne zostają ukierunkowane w komórki nerwowe i rozpoczynają dalsze różnicowanie w tym kierunku pod wpływem wielu różnych czynników [4,67,72].

ORGANIZATOR

Pączek ogonowy wzbudził zainteresowanie jako centrum organizacyjne tylnej części zarodka. Cechuje się bowiem właściwościami organizatora gastruli.

Organizator gastruli, czyli organizator pierwotny, jest to zespół komórek młodego zarodka kręgowca, pod którego wpływem w czasie gastrulacji tworzą się zawiązki narządów osiowych cewy nerwowej, struny grzbietowej i mezodermi przyosiowej. Organizator wyznacza główne osie zarodka przednio-tylną i grzbietowo-brzuszną. U płazów (organizator Spemanna) jest to wargę grzbietową blastoporu, u owodniowców węzeł pierwotny tarczki zarodkowej. Właściwości organizatora zostały określone eksperymentalnie. Cechuje się tym, że po przeszczepieniu w ektotopowe miejsce lub do innego zarodka jest on zdolny do indukowania dodatkowych narządów osiowych, w których tworzeniu biorą udział zarówno komórki organizatora, jak i zwerbowane przez niego komórki gospodarza. Już według pierwotnej koncepcji odkrywców organizatora Spemanna i Mangold [1924] wyróżniono w organizatorze płazów trzy rejony: organizator głowy, organizator tułowia i organizator ogona, odpowiedzialne odpowiednio za wydzielenie tych trzech części ciała zarodka. Obecnie uważa się, że organizator gastruli jest dynamiczną strukturą o stale zmieniającej się funkcji i składzie komórek, co przejawia się także zmianą ekspresji genów i charakteru komórek progenitorowych. Tylko niewielka część komórek organizatora to komórki stacjonarne, tzn. stale w nim przebywające. Większość komórek znajdujących się w nim w danym momencie rozwoju jest w trakcie przesuwania się przez niego. Te przejściowe komórki są stale werbowane (z ektodermi u płazów, z epiblastu u owodniowców) i tu zostają ukierunkowywane w komórki progenitorowe, a przeznaczenie ich zmienia się w trakcie rozwoju. Stąd organizator kolejno indukuje inne odcinki narządów osiowych wzdłuż osi A/P. Wczesny organizator (ang. *early gastrula organizer* – EGO) indukuje struktury głowowe, późny organizator (ang. *mid gastrula organizer* – MGO) struktury tułowiowe, a pączek ogonowy struktury tylne [42]. Część zwerbowanych komórek pozostaje w organizatorze jako niezróżnicowane komórki macierzyste dla narządów osiowych. Organizator stymuluje również ruchy morfogenetyczne ukierunkowanych progenitorów. U owodniowców w funkcji organizatora bierze udział zarówno węzeł pierwotny, jak i przednia część smugi pierwotnej (szersze omówienie patrz [6,9,72]).

Właściwości pączka ogonowego odpowiadają wymienionym wyżej cechom organizatora. Zachowuje on właściwości zarówno węzła pierwotnego, jak i przedniej części smugi pierwotnej. Zachodzi w nim intensywna proliferacja i ruchy morfogenetyczne komórek. Ma możliwości tworzenia z samego siebie cewy nerwowej i struny grzbietowej oraz „werbowania” do tych narządów komórek jeszcze nieukierunkowanych. Przeszczepiony do jamy blastuli młodszego zarodka *Xenopus* powodował powstanie nowej tylnej cewy nerwowej i struny grzbietowej oraz mezenchymatycznego wyrostka, pokrytego ektoderłą przypominającego ogonek [27]. Pączek ogonowy wszczepiony w ektotopowe miejsce blastodermi kury indukował powstanie drugiej wtórnej cewy nerwowej i struny grzbietowej otoczonych somitami [45]. Co trzeba podkreślić indukcja nowej cewy nerwowej zachodziła nie tylko w polu jasnym, ale także w polu ciemnym tarczki zarodkowej przeznaczonym normalnie do wytworzenia pozazarodkowych błon płodowych. Zaindukowana ektotopowo cewa nerwowa wykazywała obecność markerów neuralnych: glikoproteiny L5 i ekspresję genów *sox-2* oraz genów markerowych dla tylnych części cewy nerwowej *Pax-3* (charakterystycznego dla tyłomózgowia i rdzenia kręgowego) i *hoxb-8* (charakterystycznego dla tylnej części rdzenia kręgowego). Nie wykazano w niej natomiast ekspresji genów charakterystycznych dla przedniej części cewy nerwowej *otx-2* i *en-1* [45]. Zaindukowane dodatkowe struktury osiowe u *Xenopus*, jak i u ptaków zawierały zarówno komórki gospodarza, jak i dawcy, co wskazuje, że pączek ogonowy ma zdolność wytwarzania struktur osiowych ze swoich komórek, ale także zdolność werbowania do tego procesu komórek gospodarza. Wskazuje jednocześnie, że pączek ogonowy tak jak organizator Spemann i węzeł pierwotny stymuluje przemieszczanie się komórek związane z tworzeniem się narządów osiowych.

Wyniki eksperymentów Davisa i Kirschnera [21] z izolowanymi wyznakowanymi pojedynczymi komórkami pączka ogonowego *Xenopus* wskazują, że aktywność organizatora w pączku ogonowym nie zależy od zwartej stosunkowo dużej grupy komórek jak w czasie gastrulacji, lecz może być funkcją kilku małych grup niezdeteminowanych komórek rozsianych w obrębie mezenchymy pączka, wśród komórek już ukierunkowanych w komórki nerwowe lub somitę [21].

Pączek ogonowy stanowi niewątpliwie organizator tylnej i ogonowej części zarodka. Zachowuje bardzo długo właściwości indukujące i właściwość organizowania osi przednio-tylnej. Jest on „magazynem” komórek niezróżnicowanych i pluripotentnych. Może służyć jako pożyteczny obiekt do badań eksperymentalnych nad molekularną interakcją komórek w czasie gastrulacji i różnicowania się komórek, ale może także posłużyć jako źródło komórek niezróżnicowanych.

LITERATURA

- [1] ABU-ABED S, DOLLE P, METZGER D, BECKETT B, CHAMBON P, PETKOVICH M. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures, *Genes Dev* 2001; **15**: 226–240.
- [2] ABU-ABED S, DOLLE P, METZGER D, WOOD C, Mac LEAN G, CHAMBON P, PETKOVICH M. Developing with lethal RA levels: genetic ablation of RAGR can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Development* 2003; **130**: 1449–1459.

- [3] van der AKKER E, FORLANI S, CHAWENGSAKSOPHAK K, De GRAAF W, BECK F, MEYER BI, DESCHAMPS J. *Cdx1* and *Cdx2* have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 2002; **129**: 2181–2193.
- [4] ALTMANN CR, BRIVANLOU AH. Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol* 2001; **203**: 447–482.
- [5] AVARON F, THAERON-ANTONO C, BECK CM, BORDAY-BIRRAUX V, GERAUDIE J, CASANE D, LAURENTI P. Comparison of even-skipped related gene expression pattern in vertebrates shows an association between expression domain loss and modification of selective constraints of sequences. *Evol Dev* 2003; **5**: 145–156.
- [6] BARTEL H. Embriologia. PZWL, Warszawa 1995.
- [7] BECK CW, SLACK JMW. A developmental pathway controlling outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Development* 1999; **126**: 1611–1620.
- [8] BELLAIRS R, SANDERS EJ. Somitomeres in the chick tail bud; a SEM study. *Anat Embriol* 1986; **175**: 235–240.
- [9] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Zarys organogenezy, różnicowanie się komórek w narządach. PWN Warszawa 2004.
- [10] BORELLO U, COLETTA M, TAJBAKSH S, LEYNS L, DeROBERTIS E, BUCKINGHAM M, COSSU G. Transplacental delivery of the Wnt antagonist *Frzb1* inhibits development of caudal paraxial mesoderm and skeletal myogenesis in mouse embryos. *Development* 1999; **126**: 4247–4255.
- [11] BURKE AC, NELSON CE, MORGAN BA, TABIN C. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 1995; **121**: 333–346.
- [12] BROWDER LW, ERICKSON CA, JEFFREY WR. Developmental biology. 3 ed, Saunders College Publishing 1991.
- [13] CAMBRAY N, WILSON V. Axial progenitors with extensive potency are localized to the mouse chondro-neural hinge. *Development* 2002; **129**: 4955–4855.
- [14] CATALA M, TEILLET MA, LE DOUARIN NA. Organization and development of the tail bud analyzed with quail-chick chimera system. *Mech Dev* 1995; **51**: 51–65.
- [15] CATALA M, TEILLET MA, DE ROBERTIS EM, LE DOUARIN N. A spinal cord fate map in avian embryo: while regressing Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 1996; **122**: 2599–2610.
- [16] CHAMBERS D, MASON I. Expression of *sprouty2* during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. *Mech Dev* 2000; **91**: 261–364.
- [17] CHAPMAN DL, COOPER-MORGAN A, HARRELSON Z, PAPAIOANNOU VE. Critical role for *Tbx7* in mesoderm specification in the mouse embryo. *Mech Dev* 2003; **120**: 837–847.
- [18] CHAWENGSAKSOPHAK K, De GRAAFF N, DESCHAMPS J, BECK F. *Cdx2* is essential for axial elongation in mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 7641–7645.
- [19] CROSSLEY PH, MARTIN GR. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in developing embryo. *Development* 1995; **121**: 439–451.
- [20] CUI J, MICHAILLE JJ, JINNG W, ZILE MH. Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and rapid induction of RARs by retinoic acid. *Dev Biol* 2003; **260**: 496–511.
- [21] DAVIS RL, KIRSCHNER MW. The fate of cells in the tailbud of *Xenopus laevis*. *Development* 2000; **127**: 255–267.
- [22] DOBBS-McAULIFFE B, ZHA O, LINNEY E. Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo. *Mech Dev* 2004; **121**: 339–350.
- [23] DOBRULLE J, POURQUIE O. *Fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 2004; **427**: 415–422.
- [24] ECONOMIDES KD, ZELTSER L, CAPECCHI MR. *Hoxb13* mutations cause overgrowth of caudal spinal cord and tail vertebrae. *Dev Biol* 2003; **256**: 317–330.
- [25] GAJOVIC S, KOSTOVIC-KNEZEVIC L. Ventral ectodermal ridge and ventral ectodermal groove: two distinct morphological features in the developing rat embryo tail. *Anat Embryol* 1995; **192**: 181–187.
- [26] GILBERT SF. Developmental biology. 4 ed. Sinauer Association 1994.
- [27] GONT IK, STEINBEISSER H, BLUMBERG B, De ROBERTIS EM. Tail formation as a continuation of gastrulation; the multiple cell population of *Xenopus* tailbud derive from late blastopore lip. *Development* 1993; **119**: 991–1004.
- [28] GOFFLOT F, HALL M, MORRIS-KAY GM. Genetic patterning of the developing mouse tail at the time of posterior neuropore closure. *Dev Dyn* 1997; **210**: 431–445.

- [29] GRECO TL, TAKADA S, NEWHOUSE MM, Mc MAHON JA, Mc MAHON AP, CAMPER SA. Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulation mouse axial development. *Genes Dev* 1996; **10**: 313–324.
- [30] GRIFFITH CM. Midkine and secondary neurulation. *Teratology* 1997; **55**: 213–223.
- [31] GRIFFITH CM, HSIEH T, SMITH C, SANDERS EC. Glycoconjugates in normal and abnormal secondary neurulation. *Teratology* 1995; **52**: 296–297.
- [32] GRIFFITH CM, SANDERS EJ. Effects of extracellular matrix components on the differentiation of chick embryo tail bud mesenchyme in culture. *Differentiation* 1991; **47**: 61–68.
- [33] GRIFFITH CM, WILEY MJ. Distribution of cell surface glycoconjugates during secondary neurulation in the chick embryo. *Anat Rec* 1990; **226**: 81–90.
- [34] GRIFFITH CM, WILEY MJ. Sialoconjugates and development of the tail bud. *Development* 1990; **108**: 479–489.
- [35] GRIFFITH CM, WILEY MJ. Effects of retinoic acid on chick tail bud development. *Teratology* 1991; **43**: 217–224.
- [36] GRIFFITH CM, WILEY MJ. N-CAM, polysialic acid and chick tail bud development. *Anat Embryol* 1991; **183**: 205–212.
- [37] GRIFFITH CM, ZILE MH. Retinoic acid, midkine, and defects of secondary neurulation. *Teratology* 1990; **62**: 123–133.
- [38] HALL BK. A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth / morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice. *Cell Tissues Organs* 2000; **166**: 6–14.
- [39] HOLDER N, KLEIN R. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 1999; **126**: 2033–2044.
- [40] HIRANO S, TANAKA H, OHTA K, NORITA M, HOSHINO K, MAGURO R, KASE M. Normal ontogenic observations on the expression of Eph receptor tyrosine kinase, Cdk8, in chick embryos. *Anat Embryol* 1998; **197**: 187–197.
- [41] IKEYA M, TAKADA S. Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of cdx-1 expression. *Mech Dev* 2001; **103**: 27–33.
- [42] KINDER SJ, TSANG TE, WAKAMIYA M, SASAKI H, BEHRINGER RR, NAGY A, TAM PPL. The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* 2001; **128**: 3823–3834.
- [43] KOSTOVIC-KNEZEVIC L, GAJOVIC S, SVAJGER A. Morphogenetic feature in the tail region of the rat embryo. *Int J Dev Biol* 1991; **35**: 191–195.
- [44] KNEZEVIC V, DE SANTO R, MACKEM S. Two novel chick T-box genes related to mouse *Brachyury* are expressed in different, non-overlapping mesodermal domains during gastrulation. *Development* 1997; **124**: 411–419.
- [45] KNEZEVIC V, DE SANTO R, MACKEM S. Continuing organizer function during chick tail development. *Development* 1998; **125**: 1791–1801.
- [46] KRENN, OSTERMAYER M, WACHTLER F. On the histogenetic potency of the tailbud mesoderm. *Anat Embryol* 1990; **181**: 595–601.
- [47] KRZANOWSKA H, SOKÓŁ-MISIAK W. [red] Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego. PWN Warszawa 2002
- [48] Mac LEAN G, ABU-ABED S, DOLLE P, TAHAYATO A, CHAMBON P, PETKOVICH M. Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev* 2001; **107**,1: 95–201.
- [49] LIU C, KNEZEVIC V, MACKEN S. Ventral tail bud mesenchyme is signaling center for tail paraxial mesoderm induction. *Dev Dyn* 2004; **229**: 600–606.
- [50] MADEN M, SONNEVELD E, van der SANG PT, GALE E. The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implication for developmental mechanisms. *Development* 1999; **125**: 4133–4144.
- [51] MANSOUR SL. Targeted disruption of int-2 [fgf-3] causes developmental defects in the tail. *Mol Reprod Dev* 1994; **39**: 62–57.
- [52] MILLS CL, BELLAIRS R. Mitosis and cell death in the tail of the chick embryo. *Anat Embryol* 1989; **180**: 201–308.
- [53] MILLER S A, BRIGLIN A. Apoptosis removes chick embryo tail bud and remanent of the primitive streak. *Dev Dyn* 1998; **206**: 212–218.
- [54] MORALES A V, de la ROSA E J, de FABLO F. Expression of the cCdx-B homeobox gene in chick embryo suggests its participation in rostrocaudal axial patterning. *Dev Dyn* 1996; **206**: 343–363.

- [55] NAIT-OUMESMAR B, STECCA B, FATTERPAKER G, NAIDICH T, CORBIN J, LAZZARINNI R. Ectopic expression of Gcm1 induces congenital spinal cord abnormalities. *Development* 1996; **129**: 3957–3964.
- [56] NAKASHIMA M, TOYONO T, AKAMINE A, JOYNER A. Expression of growth / differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 1999; **80**: 185–189.
- [57] NICOLAS J F, MATHIS I, BONNEROT C, SAURIN W. Evidence in the mouse for self-renewing stem cells in the formation of segmented longitudinal structure, the myotome. *Development* 1995; **122**: 2933–2946.
- [58] PADMANABHAN R. Retinoic acid-induced caudal regression syndrome in the mouse fetus. *Reprod Toxicol* 1998; **12**: 39–151.
- [59] PASTEELS J. La formation de la queue chez les Vertebres. *Ann Soc Royal Zool Belgique* 1939; **70**: 33–51.
- [60] McPHERRON A C, LAWLER A M, LEE S J. Regulation of anterior / posterior patterning of axial skeleton by growth / differentiation factor 11. *Nat Genet* 1999; **22**: 260–264.
- [61] SANDERS E J, KHARE M K, OOI V C, BELLAIRS R. An experimental and morphological analysis of the tail bud mesenchyme of the chick embryo. *Anat Embryol* 1986; **174**: 179–165.
- [62] SAPUNAR D, VILOVIC K, ENGLAND M, DARAGA-BABIC M. Morphological diversity of dying cells during regression of the human tail. *Ann Anat* 2001; **183**: 217–222.
- [63] SCHOENWOLF GC. Tail [end] bud contributions to the posterior region of the chick embryo. *J Exp Zool* 1977; **201**: 227–246.
- [64] SCHOENWOLF GC, DE LONGO J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. *Am J Anat* 1980; **158**: 43–63.
- [65] SHAMIN H, MASON I. Expression of Fgf4 during early development of the chick embryo. *Mech Dev* 1999; **85**: 189–192.
- [66] SHUM AS, POON LL, TANG WW, KOIDE BW, LEUNG YC, SHIROISHI T, COOP AJ. Retinoic acid induces down-regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to neural fate in the mouse embryo. *Mech Dev* 1999; **84**: 17–30.
- [67] STREIT A, STERN CD. Neural induction, a birds' eye view. *TIG* 1999; **15**: 20–24.
- [68] SCHWARTZ ME, EBERHART J, PASQUALE EB, KRULT C. EphA4 / ephrin 5a interaction in muscle precursor cell migration in avian forelimb. *Development* 2001; **128**: 4669–4680.
- [69] TAM PP, TAN SS. The somitogenesis potential of cells in the primitive streak and tail bud of the organogenesis-stage mouse embryo. *Development* 1992; **115**: 703–715.
- [70] TAM PPL, TRAINER PA. Specification and segmentation of the paraxial mesoderm. *Anat Embryol* 1994; **189**: 275–305.
- [71] TUCKER AS, SLACK JMW. The *Xenopus laevis* tail-forming region. *Development* 1995; **121**: 249–252.
- [72] TWYMAN RM. Biologia rozwoju. PWN, Warszawa, 2003.
- [73] WILSON V, BEDDINGTON RS. Cell fate and morphogenetic movement in the late mouse primitive streak. *Mech Dev* 1996; **55**: 79–89.
- [74] YAMAGUCHI TP, BRADLEY A, McMAHON AP, JONES S. A Wnt5 pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 1999; **126**: 1211–1223.
- [75] YUAN S, SCHOENWOLF GC. *De novo* induction of the organizer and formation of the primitive streak in an experimental model of notochord reconstitution in avian embryos. *Development* 1998; **125**: 201–213.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 15.08.2004 r.

Przyjęto: 02.10.2004 r.

Adres autora: 01-517 Warszawa, ul. Mickiewicza 21 m. 12

ROLA TRANSPORTU BŁONOWEGO W ZJAWISKU OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ

THE ROLE OF CELLULAR MEMBRANE TRANSPORT IN THE MULTIDRUG RESISTANCE

Dorota JAKONIUK

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
w Warszawie

Streszczenie: Zjawisko oporności wielolekowej jest częstym powodem niepowodzeń chemoterapii nowotworów. Zbadano wiele mechanizmów komórkowych wpływających na efekty cytotoksyczne leków przeciwnowotworowych. Jedną z najintensywniej badanych form oporności komórek na terapię jest oporność wywołana nadekspresją glikoprotein błonowych. Niektóre białka błonowe odpowiedzialne za transport błonowy leków oraz geny je kodujące zostały zidentyfikowane i scharakteryzowane. Odgrywają one ważną rolę w redukcji stężenia wewnątrzkomórkowego leków. Ich ekspresja została wykazana w wielu ludzkich komórkach nowotworowych, jak i w prawidłowych tkankach. Stwierdzono, że wiele leków hamuje funkcje białek związanych z transportem błonowym. Szereg z nich wykazuje efekty toksyczne. Ważnym zagadnieniem jest poszukiwanie nowych związków o lepszym indeksie terapeutycznym mogących znaleźć zastosowanie w terapii nowotworów.

Słowa kluczowe: oporność wielolekowa, P-glikoproteina, transport.

Summary: Multidrug resistance is a frequent cause of the failure of chemotherapy in the treatment of cancer. Many cellular mechanisms, by which tumor cells may evade the cytotoxic effects of anticancer agents, were investigated. Multidrug resistance strongly linked to the overexpression of membrane-associated glycoprotein is one of the best understood and most intensively studied forms of mammalian drug resistance. Some of the membrane protein responsible for drug efflux has been identified and its structure and function characterized. They appear to play an important role in drug efflux. Expression of these proteins in many human tumors, as well as in normal tissues has been shown. A large number of drugs, which inhibit the function of transported protein, have been identified. Many of them have proven toxic effects, and thus the identification of novel agents for potential clinical use has taken on great importance.

Key words: multidrug resistance, P-glycoprotein, transport.

WSTĘP

Skuteczność działania chemoterapeutyków, stosowanych w leczeniu chorób nowotworowych, w celu zniszczenia komórek nowotworowych przy jak najmniejszym uszkodzeniu komórek prawidłowych nosiciela nowotworu, ogranicza pojawiająca się oporność, czyli brak wrażliwości na dany lek [25]. Oporność stwierdzoną już po pierwszym podaniu leku określa się jako oporność wrodzoną. Częściej jednak, w wyniku wielokrotnego podawania leku, pojawia się tzw. oporność nabyta. Powszechny problem stanowi zjawisko oporności wielolekowej (z ang. *multidrug resistance*, MDR). O oporności wielolekowej mówi się wówczas, gdy komórki poddawane działaniu jednego leku stają się odporne na ten lek oraz inne strukturalnie i funkcjonalnie odmienne leki, czyli wykazują tzw. oporność krzyżową. MDR wywołują chemoterapeutyki należące do różnych grup, np. antybiotyki (daunorubicyna, adriamycyna, aktynomycyna D), alkaloidy izolowane z roślin z rodziny *Vinca* (np. winkrystyna, winblastyna), pochodne podofyloksyn (np. etopozyd, tenipozyd) oraz taksany (np. taksol).

Fenotyp oporności lekowej jest związany ze zwiększonym wypływem leków z komórki. Jeden z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność wielolekową jest oparty na zmianach w profilu glikoprotein błonowych, komórek opornych wielolekowo. Nadekspresja szeregu glikoprotein decyduje o niskim stężeniu leków w komórkach spowodowanym aktywnym transportem na zewnątrz, w wyniku działania tzw. energozależnej (ATP zależnej) pompy błonowej. Obniżona akumulacja leku w komórkach opornych jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia wytworzonej oporności [5, 23, 25, 38].

TABELA 1. Dane z badań *in vitro* i *in vivo* zjawiska MDR

Białko	Rodzaj nowotworu	Oporność na leki przeciwnowotworowe
Pgp	białaczka, nerwiak niedojrzały, chłoniak, nowotwór piersi, trzustki, okrężnicy, wątroby, nerek, kory nadnerczy, jajników, płuc	winkrystyna, winblastyna, doksorubicyna, daunorubicyna, etopozyd, tenipozyd, paklitaksel, kolchicina, aktynomycyna D, mitomycyna C, mitoksantrol
MRP1	białaczka, nerwiak niedojrzały, chłoniak, nowotwór płuc, tarczycy, żołądka, przełyku	winkrystyna, winblastyna, doksorubicyna, daunorubicyna, etopozyd, tenipozyd, metotreksat
MRP2	białaczka, nowotwór płuc, nerek, żołądka, okrężnicy	winkrystyna, winblastyna, cisplatyna, metotreksat
MRP3	nowotwór okrężnicy, płuc, nerek, jajników	doksorubicyna, winkrystyna, etopozyd, tenipozyd, metotreksat
MRP4	białaczka	tiopuryny, metotreksat
BCRP	białaczka, nowotwór piersi, łożyska, płuc, wątroby, jelit	doksorubicyna, daunorubicyna, epirubicyna, etopozyd, topotekan, mitoksantron

Badania różnic w błonach komórkowych komórek wrażliwych i opornych pozwoliły zaobserwować zwiększoną zawartość glikoproteiny o m.cz. 170–190 kDa w błonach komórek opornych. Stopień wytworzonej oporności na leki wykazywał dużą zbieżność z zawartością tej glikoproteiny. Błonowa glikoproteina o masie 170 kDa została wyizolowana i scharakteryzowana jako P-glikoproteina (z ang. *P-glycoprotein*, Pgp). Przypisano jej funkcję białka transportującego leki na zewnątrz komórki [5, 31]. Później zidentyfikowano inne glikoproteiny, również odpowiedzialne za eliminację leków z komórki. Należą do nich m.in. białka oporności wielolekowej MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6 (z ang. *MDR-associated protein*), białko oporności komórek nowotworowych płuc – LRP (z ang. *lung resistance protein*), białko oporności komórek nowotworowych piersi – BCRP (z ang. *breast cancer resistance protein*) oraz białko odpowiedzialne za transport soli żółciowych – BSEP (z ang. *bile salt export protein*). Nadekspresja tych glikoprotein jest podstawowym mechanizmem wywołującym oporność wielolekową i zmniejszającym skuteczność leczenia chorób nowotworowych [38]. W tabeli 1 przedstawiono dane z badań *in vitro* i *in vivo* zjawiska MDR [11].

STRUKTURA I FUNKCJE P-GLIKOPROTEINY

P-glikoproteina (ABCB1) jest kodowana przez wiele genów tworzących grupę *mdr*. W komórkach ludzkich występują 2 geny *mdr*: *mdr1* i *mdr2*, znajdujące się na chromosomie 7, przy czym tylko gen *mdr1* związany jest bezpośrednio z opornością wielolekową [27]. Ekspresja tego genu jest niezbędna i wystarczająca do pojawienia się oporności, natomiast stopień oporności komórek może być skutkiem zamplifikowania tego genu i jego nadekspresji. P-glikoproteina jest integralnym białkiem błonowym zbudowanym z jednego łańcucha polipeptydowego, w którego skład wchodzi 1280 aminokwasów, co daje peptyd o masie cząsteczkowej 140 kDa. Białko to składa się z dwóch części o podobnej budowie, z których każda zawiera fragment hydrofobowy i hydrofilowy [14, 27, 38]. Pomiedzy dwiema połówkami P-glikoproteiny istnieje 43-procentowa homologia [23, 30]. Fragment hydrofobowy stanowią trzy pętle przebijające błonę w sześciu miejscach. Sześć transbłonowych fragmentów tworzy kanał, przez który substancje przekraczają błonę komórkową. Fragmenty te odgrywają ważną rolę w określaniu specyficzności substratowej glikoproteiny. Umiejscowiony po cytoplazmatycznej stronie błony fragment hydrofilowy zawiera potencjalne miejsca wiązania nukleotydu ATP, tzw. NBD (z ang. *nucleotide binding domain*). C- i N-koniec polipeptydu zlokalizowany jest wewnątrzkomórkowo. Pierwsza zewnątrzkomórkowa pętla jest glikolizowana w trzech miejscach. Dojrzała Pgp ma masę cząsteczkową 170–180 kDa. Wiele badań sugeruje, że glikolizacja nie jest konieczna do transportu substratów przez P-glikoproteinę, natomiast jest wymagana do translokacji P-glikoproteiny do błon plazmatycznych [14, 38]. Obecnie nie ma wątpliwości, że P-glikoproteina należy do rodziny białek transportujących tzw. ABC (z ang. *ATP-binding cassette*), które używają energii z hydrolizy ATP do transportu substancji przez błony komórkowe [4, 14,

15, 17, 19, 23, 27, 30, 32, 38]. Jest ona ATP-azą, która może ulec inaktywacji w wyniku mutacji nawet tylko w jednym miejscu wiązania ATP, co wskazuje na fakt, że oba miejsca wiązania ATP są niezbędne do prawidłowego jej funkcjonowania. Badania procesu wiązania leku przez P-glikoproteinę sugerują, że hydroliza ATP nie jest konieczna do wiązania leku, ale jest niezbędna do jego transportu. P-glikoproteina oddziałuje z wieloma strukturalnie i funkcjonalnie różnymi związkami, z których większość jest przez nią transportowana. Należą do nich związki organiczne chemicznie obojętne lub obdarzone ładunkiem dodatnim [14, 38]. P-glikoproteina występuje w błonach komórkowych wielu gatunków. Hetero-genność jej masy cząsteczkowej i ładunku sugeruje istnienie rodziny podobnych cząsteczek. Znane są trzy izoformy tej glikoproteiny: Pgp I, Pgp II i Pgp III, przy czym wykazano, że tylko Pgp I i Pgp II powodują oporność wielolekową. W komórkach ludzkich występuje Pgp I i Pgp III [23, 38].

LOKALIZACJA I FUNKCJE FIZJOLOGICZNE P-GLIKOPROTEINY

P-glikoproteina znajduje się nie tylko w błonach powierzchniowych komórek nowotworowych, ale także w błonach komórek, które przylegają do kompartmentów wydzielniczych. Jej aktywność w prawidłowych tkankach sugeruje ważną rolę w transporcie błonowym ksenobiotyków [4, 23]. Ze względu na szeroki zakres transportowanych substancji chroni ona komórki przed endogennymi i egzogennymi substancjami toksycznymi, poprzez tworzenie bariery kontrolującej ich napływ do organizmu oraz tempo ich transferu pomiędzy różnymi tkankami i kompartmentami [4, 6, 17].

Wyraźną zawartość P-glikoproteiny znaleziono w komórkach nabłonka przewodu pokarmowego (jelito grube i cienkie, wątroba, trzustka, śledziona), na powierzchni komórek nabłonkowych kanalików nerkowych i żółciowych, w komórkach mózgu, łożyska i jąder, w korze nadnerczy i gruczołach macicy produkujących steroidy u kobiet ciężarnych oraz po wewnętrznej stronie błon aparatu Golgiego. P-glikoproteina bierze udział w sekrecji naturalnych metabolitów i toksyn, wpływa na absorpcję ksenobiotyków w jelitach, w niektórych przypadkach ogranicza biodostępność leków doustnych oraz ułatwia wydalanie przez błonę śluzową jelita, nerki i z żółcią, jest zaangażowana w metabolizm steroidów. Pełni ważną rolę w modulowaniu dystrybucji związków hydrofobowych do mózgu, redukując przepuszczalność ksenobiotyków do centralnego układu nerwowego oraz limitując napływ leków, takich jak winkrystyna, morfina itp. Można oczekiwać, że zastosowanie jej agonistów może zmienić przepuszczalność bariery krew/mózg. Pośredniczy w usuwaniu ksenobiotyków z łożyska i jąder, kontrolując ich napływ do płodu i gonad [4, 6, 15, 17, 23, 36, 38].

STRUKTURA I FUNKCJE BIAŁEK MRP

Brak ekspresji Pgp w niektórych komórkach opornych wielolekowo spowodowało, że zaczęto poszukiwać innych białek transportujących leki. Białko MRP1 (ABCC1) zostało wyizolowane z błon plazmatycznych opornych na dokсорubicynę ludzkich komórek nowotworu płuc, w których nie zaobserwowano ekspresji P-glikoproteiny [23]. W komórkach ludzkich znaleziono jeszcze pięć izoform tej glikoproteiny: MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 i MRP6. Należą one do rodziny ABC transporterów [3, 23, 22, 38].

MRP1 zbudowana jest z 1531 aminokwasów, a sekwencja aminokwasów wykazuje tylko 15-procentowe podobieństwo do P-glikoproteiny [18, 23, 29]. MRP1 jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 170 kDa, który ulega post-translacyjnej glikozylacji tworząc glikoproteinę o masie cząsteczkowej 190 kDa. Związek ten ma budowę asymetryczną. Jeden z ostatnich modeli struktury MRP1 zakłada, że składa się ona z 5-, 6- i 4-transbłonowych fragmentów w domenie hydrofobowej odpowiednio 1, 2 i 3 oraz z dwóch hydrofilowych domen znajdujących się po wewnętrznej stronie błony. N-koniec polipeptydu znajduje się na zewnątrz komórki. MRP1 jest glikozylowana po zewnętrznej stronie błony przy asparagianie (z ang. *aspartate*, Asn) Asn¹⁹, Asn²³ i Asn¹⁰⁰⁶. Dwa inne miejsca: Asn³⁵⁴ oraz Asn¹¹⁵⁶ nie są glikozylowane [18].

MRP1 transportuje związki organiczne chemicznie obojętne oraz obdarzone ładunkiem ujemnym. Białko to wykazuje podobny mechanizm działania do P-glikoproteiny. Nadekspresja MRP1 jest związana ze wzrostem aktywności, zależnego od ATP, transportu połączeń z endogennym glutationem, glukuronianem lub siarczanem, co powoduje zmniejszoną wewnątrzkomórkową akumulację leków, prowadząc do oporności na terapię [3, 22, 23, 29, 38]. MRP1 może powodować oporność na metotreksat (z ang. *methotrexate*, MXT) oraz arsenin [7, 9, 26]. Występuje głównie w błonach komórek opornych wielolekowo, jak również jest obecna po wewnętrznej stronie błon kompartmentów, takich jak: mięśnie, płuca, śledziona, pęcherz moczowy, pęcherzyk żółciowy i kora nadnerczy [23]. Glikoproteina ta pełni ważną funkcję fizjologiczną w transporcie błonowym m.in. leukotrienów [2, 14, 15, 18]. Nadekspresję MRP1 znaleziono prawie w każdym rodzaju nowotworu [7].

MRP2 (ABCC2) została odkryta dużo wcześniej od MRP1 jako cMAOT (z ang. *canalicular multispecific anion transporter*), białko odpowiedzialne za transport bilirubiny glukuronianu w błonie hepatocytów [7, 26]. MRP2 wykazuje podobną specyficzność substratową do MRP1 z jednym wyjątkiem – jej nadekspresja powoduje oporność na cisplatynę [7, 21, 26]. MRP2 występuje głównie w nerkach, wątrobie, jelicie krętym, dwunastnicy oraz w centralnym układzie nerwowym [43], a jej nadekspresję zanotowano w 95% komórek nowotworowych nerek oraz w komórkach nowotworowych płuc, żołądka i okrężnicy [7].

MRP3 (ABCC3) podobnie jak MRP1 i MRP2 transportuje anionowe związki organiczne, głównie w połączeniach z glukuronianem [7]. Białko to zbudowane jest z 1527 aminokwasów i wykazuje 56-procentowe podobieństwo do MRP1 i 46-procentowe do MRP2. MRP3 zlokalizowana jest w błonach hepatocytów, korze nadnerczy, jelicie cienkim, nerkach i trzustce [43, 44]. Odgrywa ważną rolę w usuwaniu toksycznych substancji anionowych z wątroby w przypadku niedrożności dróg żółciowych [7, 26,

44]. Komórki z nadekspresją MRP3 wykazują oporność na etopozyd i tenipozyd, natomiast nie wykazują oporności na inne leki wywołujące MDR [7, 44]. Białko to może powodować oporność na metotreksat [7, 42, 43]. Ostatnie badania kliniczne wykazały silny związek pomiędzy ekspresją tego białka i opornością na dokсорubicynę oraz słabą zależność między MRP3 i opornością na winkrystynę, etopozyd i cisplatynę w komórkach nowotworowych płuc [7].

Dwa strukturalnie podobne białka MRP4 (ABCC4) i MRP5 (ABCC5) są odpowiedzialne za transport związków nukleozydowych stosowanych w chemoterapii nowotworów, takich jak: 6-merkaptopuryna i tioguanina. Dodatkowo mogą transportować analogi nukleozydowe stosowane w terapii antywirusowej, takie jak: 9-(2-fosforylometyloetylo)adenina (z ang. *9-(2-phosphorylmethylethyl)adenine*, PMEA) oraz azydotyminy monofosforan (z ang. *azidothymidine monophosphate*, AZT-MP) [7, 34].

Wysoki poziom MRP4 w komórkach zainfekowanych wirusem HIV chroni je przed cytotoksycznymi efektami leków antywirusowych, powodując oporność na te leki, a jednocześnie spadek stężenia wewnątrzkomórkowego leków antywirusowych prowadzi do upośledzenia supresji replikacji HIV. Badania Chen i współpracowników pokazują, że nadekspresja MRP4 w komórkach nowotworowych spowodowała upośledzenie efektów cytotoksycznych analogów tiopurynowych stosowanych w leczeniu białaczek u dzieci [34]. Ostatnie badania donoszą, że MRP4 i MRP5 mogą transportować monofosforanowe pochodne adenozyne i guanozyne, a więc mogą mieć wpływ na regulację wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznych nukleotydów, łącznie z cGMP i cAMP [9, 34].

Funkcje fizjologiczne i zaangażowanie MRP6 (ABCC6) w oporność lekową nie zostały jeszcze dobrze poznane. Nadekspresja tego genu w opornych komórkach nowotworowych prawdopodobnie związana jest z amplifikacją genu MRP1 ze względu na bliską lokalizację tych genów na chromosomie 16 [7, 21]. Mutacje białka MRP6 powodują *pseudoxanthoma elasticum*, chorobę, która uszkadza elastyczność tkanek skóry, oczu i układu naczynio-sercowego [9, 26].

Ostatnio do rodziny MRP dodano nowe analogi: MRP7, MRP8 i MRP9, ale ich funkcje fizjologiczne i aktywność biochemiczna nie zostały jeszcze poznane [38].

INNE BIAŁKA ZAANGAŻOWANE W MDR

Do białek błonowych transportujących leki, zaangażowanych w oporność wielolekową należą również: białko oporności komórek nowotworowych piersi BCRP, białko oporności komórek nowotworowych płuc – LRP oraz białko transportujące sole żółciowe BSEP.

BCRP (ABCG2) należy do podrodziny G ABC transporterów i jest znane jako gen oporności na mitoksantron (MXR) [16, 26, 28]. Białko to zidentyfikowano w ludzkich komórkach nowotworowych piersi MCF-7/AdrVp, w których nie zanotowano ekspresji

Pgp. Nadekspresja BCRP w tych komórkach spowodowała ATP-zależną redukcję stężenia antracyklin [10, 11]. BCRP jest polipeptydem zbudowanym z 665 aminokwasów tworzących sześć transbłonowych fragmentów. Białko to ma tylko jedno wiązanie nukleotydu ATP, co sugeruje, że jest półtransporterem, który funkcjonuje jako homodimer. Nadekspresja BCRP powoduje oporność na szerokie spektrum leków przeciwnowotworowych, takich jak: mitoksantron, doksorubicynę, daunorubicynę, etopozyd i epirubicynę [10, 16]. Nadekspresja ABCG2 związana jest ze słabą skutecznością chemoterapii ostrej białaczki szpikowej oraz nowotworów stałych, takich jak: rak płuc i piersi. Poza tym białko to może transportować barwniki fluorescencyjne i toksyny [16]. Wysoką ekspresję BCRP znaleziono w łożysku, mózgu oraz komórkach macierzystych, gdzie może pełnić ważną funkcję w redukcji penetracji leków oraz limitować napływ ksenobiotyków. BCRP występuje również w jelitach i w wątrobie, gdzie może brać udział w regulacji transportu toksyn i leków przeciwnowotworowych przez nabłonek układu pokarmowego [10, 16].

LRP nie należy do rodziny ABC transporterów, ale jest związane z MDR. Nadekspresja LRP została po raz pierwszy zaobserwowana w ludzkich komórkach nowotworowych płuc, w których nie znaleziono ekspresji Pgp [12]. LRP jest tzw. białkiem MVP (z ang. *major vault protein*), o masie cząsteczkowej 110 kDa, zlokalizowanym głównie w małych, subkomórkowych strukturach cytoplazmatycznych oraz w niewielkim procencie w błonie jądrowej [1, 20]. Białko to pełni ważną rolę w transporcie ksenobiotyków z jądra do cytoplazmy [12, 20]. Nadekspresja LRP powoduje słabą odpowiedź na chemoterapię nowotworów płuc, piersi i jajników oraz białaczek [35]. Białko to wywołuje oporność na leki przeciwnowotworowe, takie jak: doksorubicyna, winkrystyna, cisplatyna, karbo-platyna, malfalan, etopozyd, paklitaksel, granicydyna D oraz pełni ważną rolę w transporcie doksorubicyny z jądra do cytoplazmy [12, 20].

Białko BSEP (ABCB11), znane jako „*sister of Pgp*” (Spgp) jest odpowiedzialne za transport soli żółciowych w wątrobie. Należy do rodziny ABC transporterów i jest związane z MDR. W badaniach *in vitro* powoduje oporność na paklitaksel [26]. Mutacja genu kodującego BSEP jest odpowiedzialna za wewnątrzwątrobową cholestazę (z ang. *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*) [41].

MODELE FUNKCJONOWANIA P-GLIKOPROTEINY

Pierwsza hipoteza dotyczy funkcjonowania P-glikoproteiny jako energozależnej pompy błonowej (mechanizm bezpośredni). Tworzy ona w błonie komórkowej kanał, przez który transportuje leki kosztem energii pochodzącej z hydrolizy ATP [5, 13, 14, 15, 19, 27, 33, 37, 38]. Przyjmuje się, że P-glikoproteina ma wiele miejsc wiązania substratów, które bezpośrednio z nią oddziałują, i że wiązanie związku transportowanego jest odwracalne [15]. Ze względu na kinetykę leków, która sugeruje, że są one wykrywane i usuwane, zanim przedostaną się do cytoplazmy oraz na fakt, że są zawracane bezpośrednio z błony

komórkowej, zaproponowano hipotezę, że do ich efektywnego usuwania z błony dochodzi w skutek działania P-glikoproteiny jako flipazy odpowiedzialnej za przemieszczanie związków lipofilnych z zewnętrznej do wewnętrznej warstwy lipidowej błony komórkowej (model Higgisa i Gottesmana). Według innego modelu – Gottesmana i Pasty (*hydrophobic vacuom cleaner model*), P-glikoproteina oddziałuje bezpośrednio z substratami w błonie komórkowej i usuwa je na zewnątrz komórki [13, 23, 32].

Druga hipoteza sugeruje wpływ P-glikoproteiny na redukcję leku w komórkach opornych, poprzez redukcję gradientu pH błony komórkowej i/lub potencjału elektrycznego (mechanizm pośredni). Według tej hipotezy P-glikoproteina nie transportuje leków, ale zwiększa wewnątrzkomórkowe pH i depolaryzuje potencjał elektryczny błony komórkowej poprzez działanie jako pompy protonowej lub kanału chlorkowego [3, 14, 15, 23, 33, 385]. Mechanizm alternatywny sugeruje, że P-glikoproteina działa jako kanał generujący elektrochemiczny gradient ATP, który kieruje leki przez błonę komórkową [14, 38].

Modele opisujące mechanizmy pośrednie nie wymagają bezpośredniego wiązania leku przez Pgp, ale wyjaśniają małą specyficzność substratów tej glikoproteiny. Jakkolwiek dane eksperymentalne faworyzują bezpośredni wpływ P-glikoproteiny na MDR poprzez wiązanie i transport wielu leków. Przemawia za tym fakt, że poziom ekspresji Pgp koreluje ze stopniem oporności lekowej, że występuje ona w błonach komórkowych i sama bezpośrednio wiąże wiele leków strukturalnie i funkcjonalnie różnych [14].

FARMAKOLOGICZNA KONTROLA OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ

Zjawisko MDR jest jedną z przyczyn niskiej skuteczności chemoterapii chorób nowotworowych. Zastanawiano się nad przywróceniem komórkom nowotworowym wrażliwości na działanie związków, w stosunku do których wykazują oporność. Rozwiązaniem tego problemu może być modulacja funkcji białek transportujących odpowiedzialnych za MDR [38]. Wiele związków powoduje hamowanie funkcjonowania P-glikoproteiny jako pompy i przywraca komórkom wrażliwość. Są to tzw. uczulacze (z ang. *chemosensitizers*) lub modulatory oporności (z ang. *resistance modifiers*), które podawane razem z lekami przeciwnowotworowymi zwiększają wewnątrzkomórkową akumulację tych leków przez upośledzenie funkcji P-glikoproteiny [5, 23].

MECHANIZMY DZIAŁANIA MODULATORÓW

Bezpośredni mechanizm działania modulatorów oporności wielolekowej polega na hamowaniu aktywności P-glikoproteiny jako pompy eliminującej leki z komórki, czego rezultatem jest przywrócenie toksyczności leków w wyniku ich akumulacji w komórce [13, 25]. Modulatory mogą działać jako ligandy kompetetywne, przez oddziaływanie z miejscami wiązania leku z P-glikoproteina lub jako ligandy niekompetetywne, przez oddziaływanie z

innymi miejscami wiązania z P-glikoproteiną, powodując allosteryczne zmiany cząsteczki P-glikoproteiny i prowadząc do zahamowania wiązania leku lub jego transportu [13].

Pośredni mechanizm działania modulatorów to post-translacyjne modyfikacje P-glikoproteiny polegające na jej fosforylacji i defosforylacji. Stan ufosforylowania Pgp wpływa na aktywność tej glikoproteiny jako pompy usuwającej leki, reguluje transport leków przez błonę oraz modeluje oporność wielolekową [13, 14, 15, 27, 38]. P-glikoproteina ulega cyklowi fosforylacji przy udziale kinazy A i kinazy C, przy czym fosforylowane są przede wszystkim reszty serynowe obecne w peptydzie łączącym obie jej połówki [13]. Ostatnio zidentyfikowano 3 inne kinazy fosforylujące P-glikoproteinę, związane z błonami komórkowymi. Identyfikacja specyficznych kinaz fosforylujących Pgp ma duże znaczenie, gdyż pośrednio mogą odgrywać one ważną rolę w modulacji zjawiska oporności wielolekowej komórek. Aktywatory kinaz powodując wzmocnienie fosforylacji Pgp, redukują wewnątrzkomórkową akumulację leku i zwiększają oporność lekową komórek opornych, natomiast inhibitory redukując fosforylację Pgp, zwiększają wewnątrzkomórkową akumulację leku w komórkach opornych [14]. Wiele powszechnie stosowanych modulatorów MDR, takich jak: fenotiazyny, tamoksifen, cyklosporyna A, jest słabymi inhibitorami kinazy C. Wiadomo też, że oddziałują one z P-glikoproteiną i hamują transport leków przez mechanizm niezależny od fosforylacji tej glikoproteiny. Fakt ten powoduje, że badania wpływu zahamowania aktywności kinaz specyficznych dla Pgp na regulację zjawiska oporności wielolekowej są skomplikowane. Obecnie jednak wiadomo, że istnieją specyficzne inhibitory kinazy C, które mogą modulować funkcje P-glikoproteiny poprzez wzrost jej fosforylacji. Przykładem jest staurosporyna [13].

PODZIAŁ MODULATORÓW MDR

Modulatory oporności wielolekowej dzielone są na trzy generacje. Modulatory pierwszej generacji zostały zidentyfikowane w 1980 roku i chwilę potem wprowadzone do leczenia klinicznego [39]. Należą do nich: inhibitory kanałów wapniowych (werapamil, nikardypina, nifedypina, diltiazem), analogi kalmoduliny (trifluoroperazyna, chlorpromazyna), analogi indolowe (chinina, chinidyna) oraz cykliczny peptyd – cyklosporyna A. Zastosowanie kliniczne modulatorów pierwszej generacji zostało jednak ograniczone ze względu na ich toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych. Związki te mają swoiste działanie terapeutyczne, natomiast oporność lekową znoszą w stężeniach większych niż wymagane do ich aktywności terapeutycznej [23]. Stężenie werapamilu we krwi, potrzebne do osiągnięcia efektu zniesienia MDR, powoduje blok tętniczko-komorowy [13, 23]. Analogi kalmoduliny znoszą oporność w stężeniu, w którym wykazują działanie antypsychotyczne. Cyklosporyna A efektywnie znosi MDR w wielu liniach komórkowych, wykazuje jednak znaczną aktywność immunosupresyjną.

W celu znalezienia modulatorów o mniejszej toksyczności i większej efektywności w znoszeniu MDR zaczęto testować enancjomery oraz strukturalne analogi związków pierwszej generacji. Najszerzej zbadane i najlepiej scharakteryzowane są: dekswera-

pamil, PAK-200, valspodar (PSC-833) i biricodar (VX-710). Związki te należą do modulatorów drugiej generacji. R-enancjomer werapamilu – dekswerapamil ma 10 razy silniejsze działanie od werapamilu w znoszeniu oporności i nie wykazuje aktywności antagonistycznej w stosunku do kanału wapniowego (nie jest kardi toksyczny). Wiodącym związkiem, który w bardzo małym stopniu blokuje kanały wapniowe, natomiast całkowicie odwraca oporność na winkrystynę w ludzkich komórkach opornych na ten lek, jest PAK-200. Szeroko badany związek PSC 833, nieimmunosupresyjny analog cyklosporyny D, jest 10 razy silniejszy i efektywniejszy od niej samej. Jest stosowany w wielu terapiach klinicznych w połączeniu z chemoterapeutykami [39]. Wykazano, że odwraca on oporność na daunorubicynę, doksorubicynę, winkrystynę, winblastynę i taksol [13, 23, 36]. Hamuje również białko BSEP [26]. Związek VX-710, szeroko stosowany w testach klinicznych, przywraca wrażliwość komórkom z nadekspresją Pgp oraz MRP1 [39].

Modulatory drugiej generacji podawane z lekami przeciwnowotworowymi modulują MDR poprzez znaczący wpływ na farmakokinetykę i dystrybucję leków w wyniku inaktywacji P-glikoproteiny. Brak jednak selektywności tych związków do blokowania funkcji P-glikoproteiny tylko w tkankach nowotworowych oraz zmiany farmakokinetyczne przez nie indukowane powodują niepomyślny wpływ na terapię.

Modulatory oporności trzeciej generacji wykazują efektywne działanie w odwracaniu MDR w bardzo niskich stężeniach, rzędu 20–100 nM, wymagają więc małych dawek do osiągnięcia stężenia efektywnego w odwracaniu MDR [23]. Należą do nich specyficzne inhibitory P-glikoproteiny, które nie blokują innych ABC transporterów, co minimalizuje wpływ na biodostępność i wydalanie leków przeciwnowotworowych [39]. Obecnie w badaniach klinicznych znajdują się: cyklopropylodibenzosuberan (LY 335979) – 10 razy efektywniejszy od cyklosporyny A, akridonekarboksamina (GF 120918), pochodna diketopiperazyny (XR 9051), diaryloimidazol (OC 144-093) [23] oraz inhibitor białka BCRP – elakridar (GF 120918/GG918) [39]. Modulatory trzeciej generacji opracowano biorąc pod uwagę relacje pomiędzy strukturą, aktywnością i specyficznością mechanizmu oporności wielolekowej. Charakteryzują się one dużą efektywnością, selektywnością i wykazują minimalne interakcje z lekami przeciwnowotworowymi [23].

Związki, które efektywnie blokują Pgp, mają niskie powinowactwo do MRP1 lub MRP2. Inhibitorami białka MRP1 mogą być jego fizjologiczne substraty, np. leukotrieny C₄, S-decyloglutation oraz MK571 – antagonist leucotrienów D₄ lub kwasy organiczne, np.: sulfinyprazon, benzbromaron oraz probenecid. Mimo że MRP1 i 2 mają podobną specyficzność substratową, inhibitory MRP1 nie są dobrymi blokerami białka MRP2 [7].

INNE METODY ZWALCZANIA MDR

Alternatywą farmakologicznych metod zwalczania MDR są rozwijające się metody biologiczne polegające na wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych oraz terapii genowej.

Tsuruo i współpracownicy wykorzystując przeciwciała monoklonalne przeciw Pgp (MRK-16 i MRK-17) w połączeniu z inhibitorami tej glikoproteiny, zwalczyli oporność komórek nowotworowych wywołaną nadekspresją Pgp [40].

Terapia genowa wykorzystuje różne metody zwalczania oporności wielolekowej, takie jak: wyciszanie onkogenów, wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej komórek nowotworowych przez wprowadzenie nowego antygeny lub cząsteczki immunostymulującej, transdukcja tzw. genów samobójczych czy zmiana wrażliwości komórek prawidłowych na leki w wyniku wprowadzenia do nich genu opornego na dany lek. W metodach tych wykorzystuje się wektory wirusowe, które włączają żądany gen do genomu wirusa, który zakaża komórki gospodarza przez wprowadzenie obcego DNA. Np. transfekcja komórek genem oporności wielolekowej *mdr1* powoduje oporność tych komórek na chemoterapię. Metodę tę stosuje się u pacjentów leczonych dużymi dawkami chemoterapeutyków po transplantacji szpiku kostnego. Chroni ona komórki przed efektami ubocznymi chemoterapii nowotworu [8].

Do regulacji ekspresji genu *mdr1* wykorzystywane są różnorodne czynniki, m.in. sodu maślan, kwas retynowy, hormony, onkogeny i współczynniki transkrypcji, tj. czynnik jądrowy κ B, NF-IL6 i YB-1 [11].

PODSUMOWANIE

Oporność wielolekowa wywołana nadekspresją glikoprotein błonowych jest jednym z wielu komórkowych mechanizmów wpływających na efekty terapeutyczne leków przeciwnowotworowych. Zaburzenia ekspresji enzymów lub zmiana ich miejsca docelowego, zmiana aktywności leku lub jego degradacja, polepszenie naprawy DNA komórek nowotworowych lub brak zdolności tych komórek do apoptozy, to również ważne mechanizmy odpowiedzialne za oporność wielolekową komórek nowotworowych [25]. Poznanie i zrozumienie tych mechanizmów prowadzi do poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych, mających na celu przezwycięzenie oporności i zwiększenie skuteczności terapii. Poszukuje się nowych modulatorów oporności, bardziej selektywnych, mniej toksycznych, działających w niskich stężeniach oraz leków aktywnych przeciw nowotworom opornym wielolekowo, o lepszym indeksie terapeutycznym niż leki stosowane obecnie. Alternatywą farmakologicznych metod modulacji zjawiska MDR jest rozwijająca się terapia genowa.

LITERATURA

- [1] ARTS HJG, KATSAROS D, VRIES EGE, MASOBORIO M, GENTA F, DANESE S, ARISIO R, SCHEPER RJ, KOOL M, SCHEFFER GL, WILLEMSE PHB, ZEE AGJ, SUURMEIJER AJH. Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein-2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2798–2805.
- [2] BOEHNKE MICHAUD L, BUZDAR AU, ANDERSON CANCER CENTER, HOUSTON, TEX. Therapeutic intervention in breast cancer: an update. *Medscape Hematology-Oncology Journal* 1998; **1**.
- [3] BORST P, EVERS R, KOOL M, WIJNHOLDS J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**: 347–357.
- [4] BOSCH I, CROOP J. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1288**: F37–F54.

- [5] BRADLEY G, JURANKA PF, LING V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1988; **948**: 87–128.
- [6] BRINKMANN U, EICHELBAUM IR. Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy. *Drug Discov Today* 2001; **6**: 835–839.
- [7] BROST P, EVERS R, KOOL M, WIJNHOLDS J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated protein. *J Natl Cancer Inst* 200; **92**: 1295–1302.
- [8] BURSTEIN HJ. Gene therapy: trials setting the stage for the future. Conference of American Society of Clinical Oncology 35th Annual Meeting, May 15, 1999, Atlanta, Georgia.
- [9] CHEN Z-S, HOPPER-BORGE E, BELINSKY MG, SHCHAVELEVA I, KOTOVA E, KRUIH GD. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol* 2003; **63**: 351–358.
- [10] DOLEY LA, ROSS DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; **22**: 7340–7358.
- [11] DOYLE LA, YANG W, ABRUZZO LV, KROGMANN T, GAO Y, RISHI AK, ROSS DD. A multidrug resistance transporter from MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15665–15670.
- [12] FILIPITS M, JAEGER U, SIMONITSCH I, CHIZZAKI-BOFANDI C, HEINZL H, PIRKER R. Clinical relevance of the lung resistance protein in diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 3417–3423.
- [13] FORD JM. Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitizers. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 991–1001.
- [14] GERMANN UA. P-glycoprotein – a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 927–944.
- [15] GOTTESMAN MM, PASTA I, AMBUDKAR SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current Opinion in Genetics and Development* 1996; **6**: 610–617.
- [16] HAN B, ZHANG JT. Multidrug resistance in cancer chemotherapy and xenobiotic protection mediated by the half ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2004; **4**: 31–42.
- [17] HANSTEN PD, LEVY RH. Role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides in drug absorption and distribution: focus on H1-receptor antagonists. *Clin Drug Invest* 2001; **21**: 587–596.
- [18] HIPFNER DR, DEELEY RG, COLE SPC. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**: 359–376.
- [19] JOHNSTONE RW, RUEFLI AA, SMYTH MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 1–6.
- [20] KITAZONO M, SUMIZAWA T, TAKEBAYASHI Y, CHEN Z-S, FURUKAWA T, NAGAYAMA S, TANI A, TAKAO S, AIKOU T, AKIYAMA S. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1647–1653.
- [21] KOOL M, LINDEN M, HAAS M, SCHEFFER G, VREE JML, SMITH AJ, JANSEN G, PETERS GJ, PONNEN, SCHEPER RJ, OUDE ELFERNIK RPJ, BAAS F, BORST P. MRP3, an organic anion transporter able to transport anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6914–6919.
- [22] KÖNIG J, NIES AT, CUI Y, LEIER I, KEPPLER D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**: 377–394.
- [23] KRISHNA R, MAYER LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; **11**: 265–283.
- [24] KUWAMO M, UCHIYAMA T, HAYAKAWA H, ONO M, WADA M, IZUMI H, KOHNO K. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related. *Cancer Sci* 2003; **94**: 9–14.
- [25] LEHNERT M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 912–920.
- [26] LEONARD GD, FOJO T, BATES SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist* 2003; **8**: 411–424.
- [27] LING V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; **40**: S3–S8.
- [28] LITMAN T, BRANGI M, HUDSON E, FETSCH P, ABATI A, ROSS DD, MIYAKE K, RESSAU JH, BATES SE. The multidrug-resistance phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 2000; **113**: 2011–2021.

- [29] LOE DW, DEELEY RG, COLE SPC. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 945–957.
- [30] LOO TW, CLARKE DM. Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**: 315–325.
- [31] MASTERS JRW. Biochemical basis of resistance to chemotherapy. *Radiother Oncol* 1990; **19**: 297–305.
- [32] MATHENY CJ, LAMB MW, BROUWER KLR, POLLACK GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 2001; **21**: 778–796.
- [33] ROPE PD. The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1241**: 385–406.
- [34] SAMPATH J, ADACHI M, HATES S, NAESENS L, BALZARINI J, FLATLEY R, MATHERY L, SCHUETZ J. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAAPS Pharm Sci* 2002; **4**: E14.
- [35] SCHNEIDER J, GONZALEZ-ROCES S, POLLAN M, LUCAS R, TEJERINA A, MARTIN M, ALBA A. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2001; **3**: 183–191.
- [36] SOOD AK, BULLE RE. Drug resistance in ovarian cancer: from the laboratory to the clinic. *Obstet Gynecol* 1998; **92**: 312–319.
- [37] SZACHOWICZ-PETELSKA B, FIGASZEWSKI Z, LEWANDOWSKI W. Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs. *Int J Pharm* 2001; **222**: 169–182.
- [38] TEDORI E, DEI S, SCAPECCHI S, GUALTIERI F. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Farmaco* 2002; **57**: 385–415.
- [39] THOMAS H, COLEY HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; **10**: 159–165.
- [40] TSURUO T, NAITO M, TOMIDA A, FUJITA N, MASHIMA T, SAKAMOTO T, HAGA N. Molecular targeting therapy of cancer: resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 2003; **94**: 15–21.
- [41] WANG R, SALEM M, YOUSEF IM, TUCHWEBER B, LAM P, CHILDS SJ, HELGASON CD, ACKERLEY C, PHILIPS MJ, LING V. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 2011–2016.
- [42] YANG LC, CAMPLING BG, COLE SPC, DEELEY RG, GERLACH JH. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 1798–1804.
- [43] YANG LC, CAMPLING BG, VOSKOGLOU-NIKOS T, COLE SPC, DEELEY RG, GERLACH JH. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 673–680.
- [44] ZELCER N, SAEKI T, REID G, BEIJNEN JH, BORST P. Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J Biol Chem* 2001; **276**: 46400–46407.
- [45] ZENG H, BAIN LJ, BELINSKY MG, KRUGH GD. Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; **59**: 5964–5967.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 01.10.2004 r.

Przyjęto: 15.10.2004 r.

Adres autora: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego,

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

e-mail: djakoniuk@urania.il.waw.pl

ROLA ZWIĄZKÓW TIOLOWYCH W ROŚLINACH W STRESIE WYWOŁANYM METALAMI CIĘŻKIMI*

THE FUNCTION OF THIOL COMPOUNDS IN PLANTS IN HEAVY METAL STRESS

Aneta PIECHAŁAK, Barbara TOMASZEWSKA

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

Streszczenie: Prawie we wszystkich glebach obserwuje się stały wzrost zawartości metali ciężkich, głównie na skutek działań antropogenicznych. Obecność zwiększonego stężenia metali wywiera szereg niekorzystnych zmian w funkcjonowaniu komórki roślinnej. Obecność jonów metali ciężkich powoduje aktywację fitochelatynowego systemu detoksykacyjnego, w którego skład wchodzi związek niskocząsteczkowy, takie jak: cysteina, glutation i jego homologi, fitochelatyny, a także enzymy biosyntezy glutationu – syntetaza γ -glutamylcysteinowa, syntetaza glutationową oraz syntaza fitochelatynowa – enzym odpowiedzialny za syntezę fitochelatyn. Jony metali, które przedostały się do cytoplazmy, są chelatowane przez glutation lub krótko-łańcuchowe PC tworząc niskocząsteczkowe kompleksy, które następnie są transportowane do wakuoli. W wakuoli tworzą się i są przechowywane bardziej stabilne kompleksy z dużą zawartością siarki. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na możliwość użycia roślin do usuwania lub inaktywacji zanieczyszczeń z gleby i wód powierzchniowych – proces ten nazywany jest fitoremediacją.

Słowa kluczowe: metale ciężkie, detoksykacja, glutation, fitochelatyny, fitoremediacja.

Summary: A steady growth of heavy metal content being mainly the result of anthropogenic activity is observed in almost all soils. The presence of increased metal concentration leads to many unfavorable changes in plant cell functions. The presence of heavy metal ions in plant cells causes activation of the phytochelatin detoxication system, which consists of cysteine, glutathione and its homologs – phytochelatin (PCs) – and also enzymes of glutathione biosynthesis – γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase and phytochelatin synthase – an enzyme responsible for the synthesis of PCs. Ions of metals which have penetrated the cytoplasm are chelated by glutathione or short-chained PCs thus creating low-molecular complexes which are then transported into the vacuole. More stable complexes with high sulfur content are formed in the vacuole. In the recent years growing attention has been paid to the possibility of using plants in removal or inactivation of contamination from the soil and surface water – this process is called phytoremediation.

Key words: heavy metals, detoxication, glutathione, phytochelatin, phytoremediation.

*Praca finansowana z grantu KBN nr 2PO4G 069 26.

1. METALE CIĘŻKIE

W czasie ostatnich kilkudziesięciu lat obserwujemy stały wzrost zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi. Postępujące procesy industrializacji przyczyniają się do zwiększenia emisji metali do atmosfery, a także uwalniania coraz większych ich ilości do wód i gleb. Źródłem metali ciężkich mogą być między innymi emisje przemysłowe, odpady komunalne czy spalanie śmieci. Największemu zanieczyszczeniu ulegają gleby rejonów intensywnie eksploatowanych górniczo i hutniczo, np. na Górnym Śląsku, gdzie lokalnie poziom ołowiu dochodzi do 8 000 ppm. Mianem metali ciężkich określa się metale o gęstości powyżej 5 mg/cm³. Metale te dzielimy na dwie grupy, I grupa to niezbędne dla prawidłowego rozwoju roślin mikroelementy, takie jak: Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, Cu, Se. Ich niedobór powoduje zaburzenia metabolizmu, a to z kolei np. ogranicza plonowanie roślin. Metale te wchodzi w skład centrów aktywnych wielu enzymów, np. dysmutazy ponadtlenkowej (Cu, Zn – forma cytozolowa oraz Fe, Mn – forma charakterystyczna dla mitochondriów i chloroplastów), nitrogenazy (Fe, Mo), hydrogenazy (Ni), peroksydazy glutationowej (Se). Metale te często pełnią również rolę kofaktorów katalizowanych przez enzymy reakcji, dzięki czemu biorą udział w wielu procesach metabolicznych, np. w oddychaniu (stanowiąc elementy łańcucha oddechowego), fotosyntezie (wchodzą w skład łańcucha transportu elektronów) czy w pobieraniu i asymilacji innych składników pokarmowych, np. azotu.

Rośliny pobierają i gromadzą również metale ciężkie z II grupy, które zgodnie z obecną wiedzą nie są dla ich metabolizmu konieczne, a wręcz ich obecność jest silnie toksyczna dla komórki i całego organizmu, są to między innymi Pb, Cd, Sr, Ag i Au. Szkodliwy wpływ obecności metali ciężkich, a głównie ołowiu opisano w rozdziale 3.

2. POBIERANIE I TRANSPORT METALI

Metale ciężkie są pobierane przez rośliny głównie poprzez system korzeniowy, np. Cd i Pb w pH kwaśnym są pobierane całą powierzchnią korzenia, początkowo są adsorbowane na jego powierzchni, gdzie łączą się z wydzielanymi przez korzeń pektynami, śluzem (poliole) i kwasem poligalakturonowym [3].

Wyróżniamy dwa mechanizmy pobierania metali przez roślinę:

- ◆ **Sposób bierny**, np. ołów wnika do endodermy korzenia i dalej do części nadziemnej wraz z transpiracyjnym prądem wody (w podobny sposób są pobierane jony Cu²⁺, Mo²⁺ i Zn²⁺).
- ◆ **Sposób aktywny**, gdy jony metali są transportowane poprzez kanały w błonach komórkowych, transport ten przebiega z wykorzystaniem energii metabolicznej.

Mechanizm pobierania metali przez korzenie roślin jest wypadkową wielu procesów: wymiany kationowej przez błony komórkowe, transportu wewnątrzkomórkowego, procesów przebiegających w ryzosferze. Ważnym czynnikiem jest również pH gleby oraz wydzielane przez korzenie roślin kwasy organiczne i aminokwasy, które mają

bezpośredni wpływ na mechanizm pobierania metali. W warunkach niedoboru żelaza niektóre rośliny wydzielają do ryzosfery kwas mugeinowy, wspomagający pobieranie Fe z form trudno rozpuszczalnych. Z kolei w pobieraniu jonów Cd^{2+} uczestniczą wydzielane przez korzenie kwasy organiczne, np. cytrynowy, octowy, szczawiowy, winowy i fumarowy, które kompleksują jony metali i uruchamiają je z mało mobilnych form. Dodatkowym czynnikiem, który należy uwzględnić, są obecne w środowisku mikroorganizmy, mogą one poprzez produkcję i wydzielanie do podłoża szeregu związków, np. szczawianów, węglanów, siarczków, regulować biodostępność metali dla roślin [59].

Część jonów, która wniknęła do wnętrza korzeni, gromadzi się w apoplacie, a następnie ksylemem wędruje do części nadziemnych [3]. Główną barierą w transporcie radialnym w korzeniu jest endoderma, a w niej pasemka Caspariego [67]. Większość jonów metali, takich jak: Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{+} , Fe^{+} , Pb^{2+} i Hg^{2+} pobranych przez korzenie roślin, jest w nich magazynowana, a tylko niewielka ich część jest następnie przemieszczana do łodyg i liści [27,35,36]. Wyjątek stanowią jony Ag^{2+} , Mo^{2+} , Se^{2+} , które są łatwo transportowane do części zielonych oraz jony Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , których transport jest ułatwiony.

Szczególną rolę w ochronie komórki przed wniknięciem jonów metali odgrywa ściana komórkowa. Większość metali obecnych w przestrzeni międzykomórkowej zostaje zatrzymana i związana na powierzchni lub wewnątrz ściany poprzez jej składniki, np. polisacharydy, aminokwasy, kwasy, wolne grupy karboksylowe [36,37,49]. Podstawową rolę w homeostazie metali ciężkich w komórce odgrywają jednak białka transportowe. Przypuszcza się, że transport metali przez warstwy fosfolipidowe odbywa się za pośrednictwem nośników białkowych, będących białkami integralnymi błony lub pomp (ATP-azy). Nośniki mogą działać na zasadzie symportu lub antyportu, dotychczasowe badania wskazują, że jony dwuwartościowe są transportowane głównie poprzez nośniki symportowe [30]. W hiperakumulatorach cynku i kadmu *Thlaspi caerulescens* i *Arabidopsis halleri* wykazano udział nośników z rodziny ZIP w pobieraniu i akumulacji tych pierwiastków. Do rodziny tej zalicza się cztery nośniki ZIP odpowiedzialne za transport Zn oraz specyficzne dla żelaza nośniki IRT, które mogą z mniejszym powinowactwem transportować również jony Cd^{2+} . W roślinach niebędących hiperakumulatorami wykryto obecność jeszcze dwóch systemów transportujących: LCT1 – przenoszący Ca^{2+} oraz grupę nośników Nramp – transportujących Mn^{2+} i Fe^{2+} , które również mogą stanowić drogę wejścia dla metali ciężkich [30].

H^{+} -ATP-azy kontrolują gradient protonowy, który stanowi siłą napędową transportu przez błony komórkowe. Należą one do dużej grupy enzymów fosforylujących, wykrytych prawie we wszystkich organizmach, dzieli się je na pięć rodzin:

1. P-ATP-azy metali ciężkich,
2. P-ATP-azy fosfolipidowe,
3. Ca^{2+} ATP-azy typu A i B,
4. H^{+} ATP-azy,
5. ATP-azy bez określonej specyficzności.

Uważa się, że ATP-azy typu P są odpowiedzialne za transport przez błony zarówno metali koniecznych Mg^{2+} , Cu^{2+} , jak i toksycznych Cd^{2+} i Pb^{2+} [41,54,68]. Solioz i

Vulpe [51] nazwali P-ATP-azy odpowiedzialne za transport metali ciężkich – CPx-ATP-azami, ponieważ mają one konserwatywną domenę transbłonową złożoną z motywu CPx, w którego skład wchodzi fragment zaangażowany najprawdopodobniej w przenoszenie metali ciężkich:

Cysteina-Prolina-Cysteina, Cysteina-Prolina-Histydyna lub Cysteina-Prolina-Seryna

P-ATP-azy są aktywne jako białka o masie 100 kDa (monomer lub homodimer). Monomer ma 10 domen transbłonowych, zarówno koniec C i N, jak i duża hydrofilowa pętla zlokalizowane są po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej [54].

3. TOKSYCZNOŚĆ METALI CIĘŻKICH

Ze względu na powszechne zanieczyszczenie jonami Pb^{2+} , Cd^{2+} czy Hg^{2+} warstw powierzchniowych gleby w roślinach dochodzi do ich nagromadzenia w ilościach, które po wprowadzeniu do łańcucha pokarmowego stanowią realne zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz zwierząt [20]. Szczególnie niebezpieczne jest to w przypadku Pb, który do organizmu człowieka przedostaje się poprzez przewód oddechowy i pokarmowy. Ołów wprowadzony do organizmu przechodzi prawie całkowicie do krwi i powoduje inhibicję enzymów niezbędnych w procesie biosyntezy hemu: dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego ALAD i syntetazy kwasu δ -aminolewulinowego ALAS. Do narządów wewnętrznych najbardziej narażonych na szkodliwy wpływ metalu zalicza się wątrobę, nerki, szpik kostny i mózg.

Dla roślin ołów nie jest tak niebezpieczny jak dla ludzi, mogą one rosnać w środowisku wielokrotnie przekraczającym normy zawartości ołowiu. Najwcześniej zaobserwowano, iż obecność jonów Pb^{2+} prowadzi do zmian w morfologii korzeni, hamuje wzrost elongacyjny, powoduje brązowienie spowodowane zwiększoną suberynizacją oraz zmniejsza liczbę korzeni bocznych [13,16,37]. Zmiany te mogą być wywołane przez wiele czynników, między innymi: obniżenie aktywności mitotycznej komórek merystematycznych korzeni, zaburzenia C-mitozy, zaburzenia tworzenia mikrotubul, co prowadzi do zahamowania cytokinezy [28,66]. Obecność metali ciężkich, w tym Pb, w przestrzeni międzykomórkowej oraz cytoplazmie wywiera szkodliwy wpływ na wiele najważniejszych dla rośliny procesów metabolicznych, powodując zaburzenia w gospodarce wodnej oraz związany z tym spadek suchej masy [28]. Toksyczność jonów Pb^{2+} polega głównie na ich zdolności do wiązania się z grupami funkcyjnymi: sulfhydrylową –SH, karboksylową –COOH oraz aminową –NH₂, powodując zmniejszenie lub nawet utratę aktywności biologicznej białek, w tym tak ważnych enzymów, jak: RuBisco, reduktaza azotynowa czy nitrogenaza. Do ważniejszych toksycznych efektów obecności metali ciężkich zalicza się również zmiany w strukturze organelli komórkowych, np. proliferację siateczki śródplazmatycznej, zmianę kształtu diktiosomów, wakuolizację cytoplazmy itp. [69] oraz indukcję powstawania reaktywnych form tlenu, czego konsekwencją jest stres oksydacyjny [29].

Rośliny broniąc się przed toksycznym wpływem jonów metali ciężkich uruchamiają mechanizmy o charakterze uniwersalnym, które są wykorzystywane do ochrony zarówno przed działaniem metali ciężkich, jak i innych czynników abiotycznych.

4. MECHANIZMY OBRONNE ROŚLIN

Rośliny wykształciły szereg mechanizmów pozwalających im przeżywać bez widocznych zmian morfologicznych lub jak w przypadku roślin uprawnych bez obniżenia plonowania w środowisku nawet bardzo silnie zanieczyszczonym metalami ciężkimi. Można mówić o dwóch strategiach odporności roślin, pierwsza polega na unikaniu stresu, druga zaś na fizjologicznym unieczynnianiu czynnika stresowego.

4.1. Strategie unikania stresu

Mechanizm unikania stresu polega na znacznym ograniczeniu pobierania metalu. Rośliny osiągają to przez wydzielanie specyficznych ligandów do ryzosfery, które chelatują jony metali, przez zmiany biochemiczne składu ściany komórkowej oraz zmiany przepuszczalności błony komórkowej. Komórki wierzchołkowej części korzenia wydzielają różne substancje, na przykład aminokwasy, kwasy organiczne, związki fenolowe, a ponadto nierozpuszczalne w wodzie żele o dużej zawartości polisacharydów lub śluzu zawierające duże ilości kwasów poligalaktouronowych [1]. W latach osiemdziesiątych Morel [33] wykazał, iż kwas poligalakturonowy może wiązać jony takich metali ciężkich, jak: Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} , dzięki czemu modyfikuje ruchliwość kationów w obrębie ryzosfery. Niektóre rośliny zapobiegają wnikaniu Pb do komórki przez intensyfikację syntezy kalozy (β -1,3-glukon), która wprawdzie sama nie ma zdolności chelatowania jonów metali, ale stanowi „mechaniczną barierę” przed plazmalemmą [44].

4.2. Tolerancja na stres

W warunkach, gdy część metali ciężkich przedostaje się do komórki, uruchamiane są mechanizmy, które mają za zadanie unieczynnianie jonów oraz naprawę uszkodzeń spowodowanych ich obecnością. Tolerancją na stres określa się taki rodzaj odporności protoplastu, który zapewnia zachowanie integralności funkcjonalnej i strukturalnej, i to zarówno w trakcie, jak i po ustąpieniu stresu [15].

Metale ciężkie na terenie cytoplazmy są chelatowane przez różnego typu ligandy, np. fitochelatyny i inne związki tiolowe, aminokwasy oraz kwasy organiczne. Chelatowane jony są transportowane do wakuoli, gdzie po ich dysocjacji jony mogą być wiązane w trwałe kompleksy np. z kwasami organicznymi [45,74]. Rośliny mogą również aktywnie usuwać metal z komórki; Pb może być przetransportowany do ściany komórkowej w pęcherzykach diktiosomalnych lub wydzielany do apoplastu przez plazmotubule [1, 67].

Badania ultrastrukturalne wykazały obecność złogów Pb w różnych kompartmentach komórki, najczęściej był on spotykany w ścianie komórkowej, wakuoli, retikulum endoplazmatycznym, przestrzeni okołojądrowej, diktiosomach, aparacie Golgiego i plasmodesmach [69]. Rzadziej złogi ołowiu spotykano w mitochondriach [29], chloroplastach, jądrze komórkowym i jąderku [69].

4.3. Glutation i jego homologi

Glutation (GSH) jest największym niskocząsteczkowym, niebiałkowym peptydem tiolowym występującym powszechnie we wszystkich komórkach – od bakterii po komórki zwierzęce; jedną z jego podstawowych funkcji jest udział w transporcie oraz magazynowaniu zredukowanej siarki [12,14,27]. U niektórych roślin obok lub nawet zamiast GSH występują jego homologi, u których C-końcowa glicyna jest zastąpiona przez inny aminokwas [24,40]. Homologi glutationu, np. u *Fabales* – homoglutation (γ -Glu-Cys-bAla), u *Poacea* – hydroksymetyloglutation (γ -Glu-Cys-Ser), pełnią w komórce podobne funkcje jak GSH.

W ostatnich latach wykazano, że GSH bierze udział w regulacji procesu wzrostu korzeni włośnikowych, podziałów komórkowych, rozwoju zarodkowego, apoptozy, jak również wpływa na poziom ekspresji genów np. enzymów metabolizujących reaktywne formy tlenu [4,12,14,20,31,35,50,64,73]. Glutation ze względu na obecność grupy SH cysteiny odgrywa szereg ważnych funkcji w komórce zarówno roślinnej, jak i zwierzęcej. Jest on między innymi zaangażowany w regulację potencjału oksydo-redukcyjnego, stanowi substrat dla S-transferazy glutationowej (EC 2.5.1.18), katalizującej reakcję koniugacji GSH z potencjalnie toksycznymi ksenobiotykami [9], bierze udział w utrzymaniu homeostazy jonów metali [5], jest jednym z najważniejszych niskocząsteczkowych antyoksydantów [29,31] oraz stanowi substrat w procesie syntezy fitochelatin [5,14,45,56]. GSH uczestniczy w reakcjach usuwających reaktywne formy tlenu (RFT), powstające w warunkach stresu ołowiowego [29,42], między innymi w cyklu Halliwella-Asady [12] czy w reakcji peroksydazy glutationowej (E.C.1.11.1.9.). Ponadto glutation ma zdolności chelatowania wolnych jonów ołowiu, co potwierdziły badania Mehra i wsp. [32] techniką dichroizmu kołowego oraz Cruz i wsp. [6] techniką DPP (ang. *Differential Pulse Polarography*). Metal ten może wiązać się nie tylko z grupami -SH dwóch cząsteczek glutationu, ale również z atomem tlenu glicyny, a przypuszczalny stosunek liczby cząsteczek metalu i liganda w tworzących się kompleksach Pb-GSH może wynosić 1:2 lub też 1:1 [6].

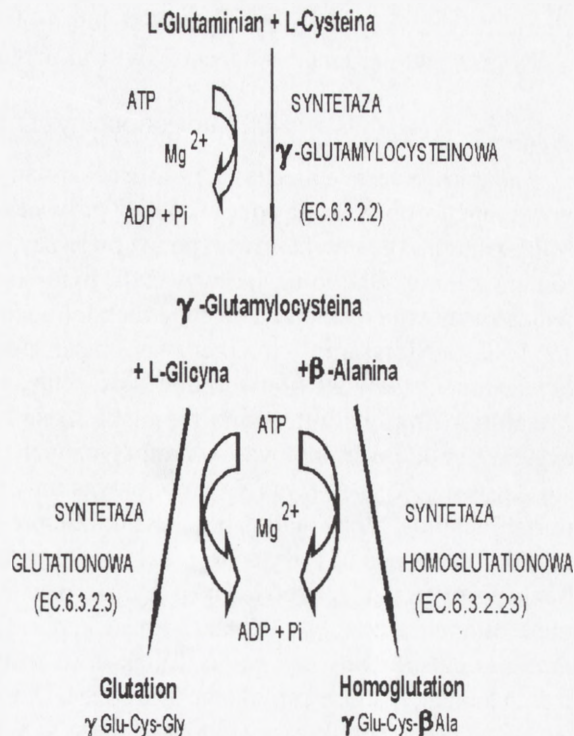
Cechą charakterystyczną GSH jest wiązanie γ -karboksylowe między L-glutaminianem a L-cysteiną, której obecność zapewnia dużą odporność na działanie komórkowych peptydaz [z wyjątkiem transpeptydazy D-glutamylowej (EC 2.3.2.1)].

Biosynteza glutationu przebiega w dwóch Mg^{2+} i ATP-zależnych reakcjach enzymatycznych (ryc. 1). W pierwszym etapie z L-Glu i L-Cys powstaje cząsteczka γ -Glu-Cys w reakcji katalizowanej przez syntetazę γ -glutamylcysteinową (γ -ECS) (EC 6.3.2.2). W drugim etapie do C-końca cząsteczki γ -Glu-Cys dodawana jest L-glicyna w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutationową (GS) (EC 6.3.2.3). Enzymy biosyntezy GSH zlokalizowano na terenie plastydów i cytozolu korzeni i liści tytoniu [34]. Badania prowadzone w latach 80' dowodzą, że enzymy odpowiedzialne za syntezę GSH charakteryzują się bardzo dużą homologią zarówno w komórkach zwierzęcych, jak i roślinnych. Poziom GSH w komórce roślinnej podlega zmianom w zależności od pory roku (w drzewach iglastych zaobserwowano akumulację GSH w trakcie zimy), wieku i stanu fizjologicznego rośliny, dostępności substratów – głównie cysteiny oraz

zapotrzebowania komórki [31,35]. Synteza GSH jest uzależniona od dostępności wszystkich trzech aminokwasów, które pochodzą z podstawowych procesów metabolicznych: L-glutaminian z procesu fotosyntezy oraz asymilacji NH_3 , L-glicyna z fotorespiracji, zaś L-cysteina powstaje w czasie fotorespiracji oraz redukcyjnej asymilacji SO_4^{2-} [27,31]. Najważniejszym aminokwasem limitującym tempo biosyntezy GSH jest cysteina. Podwyższenie poziomu cysteiny przez egzogenne podawanie siarczanów, Cys, gazowego H_2S – prowadziło do wzmożonej syntezy glutationu, wykazanej na poziomie aktywności syntetazy γ -EC [34]. W roślinach traktowanych jonami Cd^{2+} lub herbicydami również wykazano zwiększoną aktywność γ -ECS i równocześnie podwyższoną aktywność kluczowych enzymów redukcyjnej asymilacji siarki [56].

Ze względu na rolę glutationu w komórce jego biosynteza podlega złożonej kontroli, począwszy od czynników działających jako inhibitory i aktywatory reakcji enzyma-tycznych aż po czynniki wpływające na ekspresję i transkrypcję genów syntetazy γ -EC (EC.6.3.2.2) i syntetazy glutationowej GS (EC 6.3.2.3). Wykazano u *Arabidopsis thaliana*, że ekspresja genów kodujących zarówno syntetazę γ -EC, jak i GS uległa stymulacji przez jony Cd^{2+} , Cu^{2+} oraz kwas jasmonowy. [73]. U *Brassica juncea* wraz z nadekspresją γ -ECS obserwowano zwiększoną tolerancję na obecność jonów Cd^{2+} oraz znaczne podwyższenie akumulacji kadmu w porównaniu z roślinami dzikimi [76]. W przypadku nadekspresji u *Brassica juncea* genu syntetazy GSH nie obserwowano zwiększonego poziomu glutationu, nie wzrastała również tolerancja tych roślin na jony kadmu [52]. Badania na mutantach *cad 2 Arabidopsis thaliana*, u których uszkodzono gen kodujący syntetazę γ -EC, dowodzą znaczenia syntetazy w tolerancji roślin na metale ciężkie [5]. Mutanty te nie były zdolne do syntezy glutationu, wykazywały wysoką nadwrażliwość na obecność jonów kadmu, natomiast gromadziły substraty syntezy glutationu.

Badania związane z enzymami szlaku biosyntezy glutationu zaowocowały projektami przygotowania roślin transgenicznych, które znalazłyby zastosowanie w fitoremediacji. Do roślin gorczyca sarepskiej i rzodkiewnika wprowadzono geny syntetazy glutationowej *gsh II* oraz syntetazy γ -glutamylcysteinowej *gsh I*. Uzyskane rośliny transgeniczne



RYCINA 1. Szlak biosyntezy glutationu i homoglutationu

charakteryzowały się wyższą zdolnością pobierania i akumulacji kadmu oraz podwyższoną tolerancją na obecność w środowisku jonów metali.

4.4. Metalotioneiny i fitochelatyny

Badania dotyczące mechanizmów uruchamianych w komórce pod wpływem stresu wywołanego obecnością jonów metali prowadzone są od wielu lat. W 1957 roku Margoshes i Vallee wyizolowali po raz pierwszy białko z nerki końskiej wiążące się z jonami kadmu. Białko to, jak wykazali, było bogate w grupy -SH i miało zdolność wiązania metali ciężkich, nazwali je metalotioneinami MT (ang. *metallothionein*). W 1981 Akira Murasagi po raz pierwszy opisał specyficzne peptydy obecne u drożdży *Schizosaccharomyces pombe* zdolne do wiązania Cd^{2+} i nazwał je kadystynami. Metalotioneiny charakteryzują się niską masą cząsteczkową, wysoką zawartością cysteiny, brakiem aminokwasów aromatycznych i histydyny oraz często powtarzającą się sekwencją Cys-X-Cys (X – aminokwas inny niż cysteina), a powstają w wyniku normalnej biosyntezy białka, tj. w wyniku ekspresji genu, transkrypcji i translacji. Do tej pory obecność MT wykryto u człowieka, a także u innych ssaków, kręgowców, bezkręgowców i grzybów [69]. Dopiero w latach 90' stwierdzono obecność metalotionein także w roślinach, np. u *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana* czy *Ricinus communis*. Większość roślinnych MT klas I i II składa się z trzech domen, N-końca, środkowej i C-końca. Domeny N- i C-końca mają powtarzające się sekwencje aminokwasowe: Cys-X-Cys-X-X-X-Cys-X-Cys, natomiast środkowa domena nie zawiera cysteiny, a zbudowana jest głównie z aminokwasów aromatycznych i hydrofobowych. Właśnie budowa środkowej części metalotionein stanowi zasadniczą różnicę pomiędzy MT zwierzęcymi a roślinnymi [56]. W roślinach metalotioneiny występują w bardzo niskich stężeniach, dlatego ich rola najprawdopodobniej polega na zapewnieniu homeostazy metali w komórkach, nie mają natomiast znaczenia w procesie detoksykacji [17].

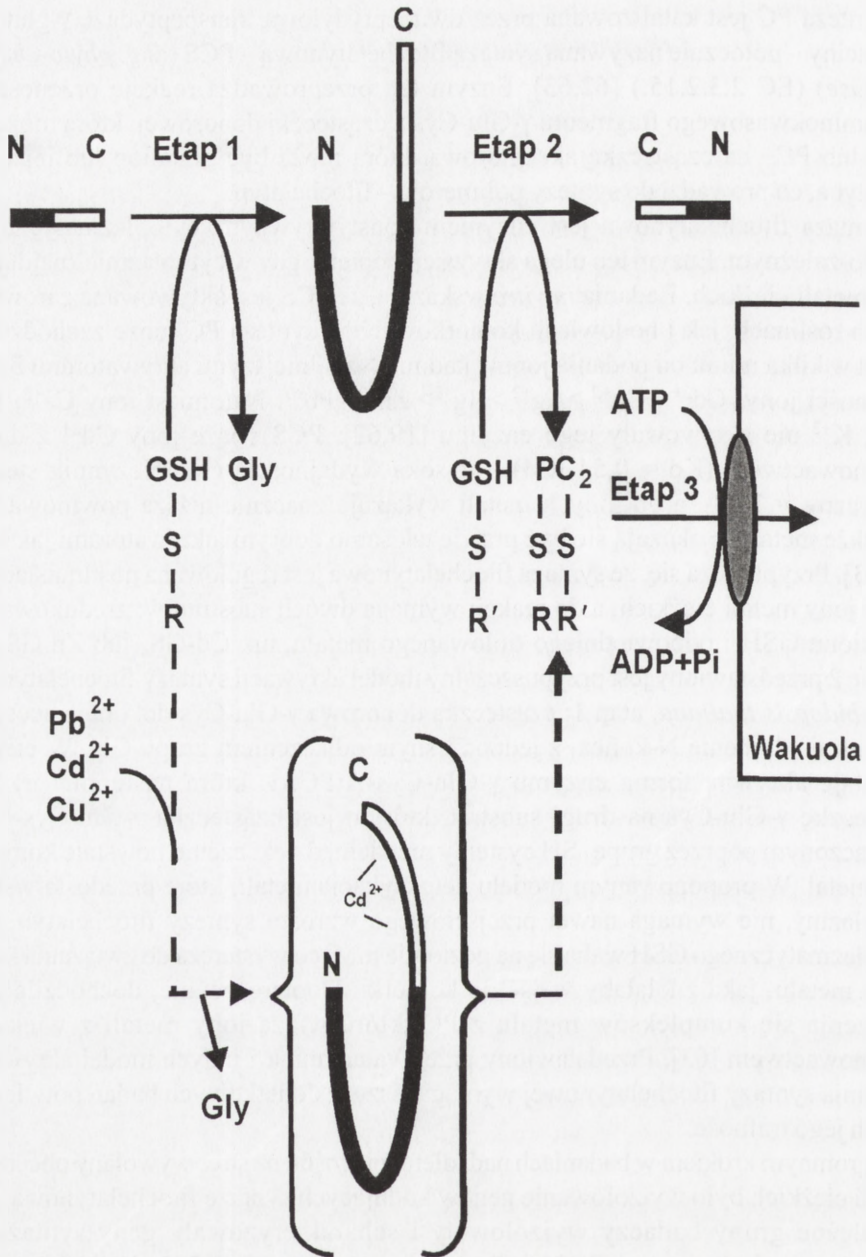
W większości roślin, oprócz metalotionein, pod wpływem metali ciężkich następuje synteza niskocząsteczkowych peptydów – metalotionein III klasy nazywanych fitochelatynami – PC (ang. *phytochelatin*). Fitochelatyny zostały po raz pierwszy opisane w 1985 roku przez Grilla i współpracowników, a materiałem badawczym była zawiesina komórkowa *Rauvolfia serpentina* eksponowana na jony Cd^{2+} . Peptydy te powstają niezależnie od rybosomów, w wyniku reakcji enzymatycznej, w której substratem jest glutation lub jego homologi [31].

Charakterystyczna jest kinetyka wytwarzania fitochelatyn o różnej długości łańcucha. We wczesnym etapie działania metalu najszybciej wzrasta ilość najkrótszej fitochelatyny PC_2 . Jednak przy dłuższym czasie działania stresora jej poziom maleje (gdyż krótkołańcuchowe PC_2 są wykorzystywane np. do syntezy fitochelatyn, takich jak PC_5 , PC_6), rośnie natomiast ilość fitochelatyn PC_3 i PC_4 [55]. Mimo iż nie ma bezpośredniego związku pomiędzy ilością syntetyzowanych fitochelatyn a tolerancją roślin na metale ciężkie, to zdolność do ich akumulacji odgrywa istotną rolę w zachowaniu homeostazy i detoksykacji metali [48].

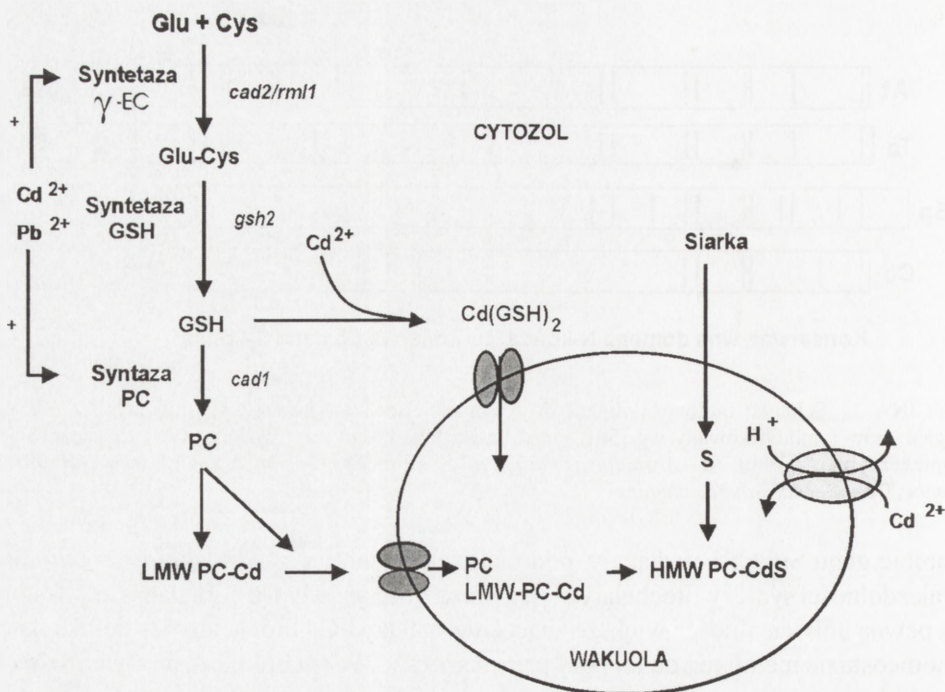
Synteza PC jest katalizowana przez dwupeptydylową transpeptydazę γ -glutamylcysteiny – potocznie nazywaną syntazą fitochelatynową – PCS (ang. *phyto-chelatin synthase*) (EC 2.3.2.15.) [62,63]. Enzym ten przeprowadza reakcję przenoszenia dwuaminokwasowego fragmentu γ -Glu-Cys z cząsteczki donorowej, którą może być GSH lub PC_2 , na cząsteczkę akceptorową, którą może być glutation lub inna fitochelatyna, co prowadzi do syntezy polimerów – fitochelatyn.

Syntaza fitochelatynowa jest enzymem konstytutywnym, cytoplazmatycznym i metalo-zależnym. Enzym ten ulega aktywacji dopiero, gdy w cytoplazmie znajdują się jony metali ciężkich. Badania *in vitro* wskazują, że PCS jest aktywowana zarówno w całych roślinach, jak i hodowlach komórkowych, a synteza PC może zachodzić już nawet w kilka minut od podania jonów kadmu. Najsilniejszymi aktywatorami były w kolejności jony: $Cd^{2+} > Cu^{+2} > Ag^{+2} > Hg^{+2} > Zn^{+2} > Pb^{+2}$. Natomiast jony Ca^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , K^{+2} nie aktywowały tego enzymu [19,62]. PCS wiąże jony Cd^{2+} z dużym powinowactwem ($K_d = 0,54 \mu M$) i wysoką wydajnością (współczynnik stechiometryczny = 7,09), a do innych metali wykazuje znacznie niższe powinowactwo, jednakże metale te okazują się być prawie tak samo dobrymi aktywatorami jak kadm [57,63]. Przypuszcza się, że syntaza fitochelatynowa jest regulowana posttranslacyjnie przez jony metali ciężkich, a do reakcji wymaga dwóch substratów: zredukowanego glutationu GSH i odpowiedniego tiolowanego metalu, np. $Cd-GS_2$ lub $Zn-GS_2$. Na rycinie 2 przedstawiony jest przypuszczalny model aktywacji syntazy fitochelatynowej u *Arabidopsis thaliana*, etap 1: cząsteczka donorowa γ -Glu-Cys dokonuje acetylacji enzymu na domenie N-końca, z jednoczesnym odłączeniem grupy Gly. W etapie 2 powstaje aktywna forma enzymu γ -Glu-Cys-AtPCS1, która następnie przenosi cząsteczkę γ -Glu-Cys na drugi substrat, którym jest cząsteczka γ -Glu-Cys-Gly z przyłączonym poprzez grupę -SH cysteiny metalem, dzięki czemu powstaje kompleks PC_2 -metal. W proponowanym modelu detoksykacja metali, które przedostały się do cytoplazmy, nie wymaga nawet przejściowego wzrostu syntezy fitochelatyn, ilość cytoplazmatycznego GSH waha się na poziomie mM, co wystarcza do związania każdej ilości metalu, jaka zdołałaby wejść do komórki. Dopiero później dochodziłoby do tworzenia się kompleksów metalu z PC, które wiążą jony metali z większym powinowactwem [63]. Przedstawiony przez Vatamaniuk i innych model aktywacji i działania syntazy fitochelatynowej wymaga jeszcze dodatkowych badań potwierdzających jego trafność.

Ogromnym krokiem w badaniach nad tolerancją roślin na stres wywołany obecnością metali ciężkich było wyizolowanie genów kodujących syntazę fitochelatynową. Trzy niezależne grupy badaczy wyizolowały i scharakteryzowały geny syntazy PC *Arabidopsis thaliana* – *AtPCS1* i *Triticum aestivum* – *TaPCS1* [19,62]. Podobne sekwencje zostały zidentyfikowane również w genomie *Schizosaccharomyces pombe* (*SpPCS1*), *Caenorhabditis elegans* (*CePCS1*), *Caenorhabditis briggsae*, *Dictyostelium discoideum* oraz u niektórych gatunków dżdżownic [60,61]. Doświadczenia, w których u *Caenorhabditis elegans* i *Dictyostelium discoideum* doprowadzono do ekspresji zidentyfikowanych genów, wykazały, że kodują one sprawną syntazę fitochelatynową [61]. Mutanty *Schizosaccharomyces pombe* z delecją w



RYCINA 2. Model aktywacji syntazy fitochelatynowej (zmodyfikowany wg [63]). R – H⁺, grupa alkilowa, R' – metal, C – domena C-końca, N – domena N-końca, Etap 1 – cząsteczka g-Glu-Cys dokonuje acetylacji enzymu na domenie N-końca, z jednoczesnym odłączeniem grupy Gly; Następuje zmiana konformacji enzymu, domeny C- i N-końca zbliżają się do siebie; Etap 2 – powstaje aktywna forma enzymu g-Glu-Cys-AtPCS1, która przenosi g-Glu-Cys na drugi substrat, kompleks g-Glu-Cys-Gly – Metal, powstaje cząsteczka PC₂-Metal; Etap 3 – kompleks PC-Metal jest transportowany do wakuoli



RYCINA 4. Schematyczny model mechanizmów komórkowych zaangażowanych w detoksykację jonów metali ciężkich na przykładzie jonów kadmu (zmodyfikowany wg [5])

wysoką wrażliwość na obecność kadmu. Ponadto zarówno u drożdzy, jak i w komórkach owsa wykazano obecność w tonoplaście antyportera H^+/Cd^{2+} , którego aktywność zależy od gradientu protonów.

W wakuoli jony Cd^{2+} przeniesione przez antyporter lub uwolnione z kompleksów LMW pod wpływem niskiego pH są wiązane i gromadzone w postaci kompleksów z kwasami organicznymi lub wysokocząsteczkowych kompleksów HMW (ang. *High Molecular Weight*) o dużej zawartości siarki. Część peptydowa kompleksów LMW może zostać podzieloną przez wakuolarne hydrolazy na fragmenty lub wolne aminokwasy, może też wracać do cytoplazmy. Stosunek jonów S^{2-} do Cd^{2+} jest wyższy w kompleksach HMW w porównaniu z kompleksami LMW. Kompleksy HMW występują na terenie wakuoli jako agregaty o średnicy 20\AA , których „jądro” stanowi krystaliczny CdS otoczony dookoła fitochelatynami. Dzięki większej zawartości siarki chelatowanie metalu w HMW jest efektywniejsze, a kompleks wykazuje wyższą stabilność [3,4]. Leopold i wsp. [26] na podstawie badań prowadzonych techniką HPLC/ICP-MS wykazali, że kompleksy z fitochelatynami tworzą jedynie Cd i Cu, natomiast Pb i Zn są chelatowane przez inne niskocząsteczkowe związki, np. kwasy organiczne. Natomiast badania prowadzone przez Mehra i wsp. [32], Cruz i wsp. [6] oraz Scarano i Morelli [47] sugerują, że również Pb tworzy kompleksy z GSH oraz PC. Wielu autorów [4,20,40;45;74] uważa, że fitochelatyny odgrywają znaczącą rolę w zachowaniu

homeostazy metali śladowych w komórce, transporcie siarki, detoksykacji metali ciężkich, jak również same wykazują własności antyoksydacyjne. Potwierdzają to badania prowadzone przez Tsuji i wsp. na glonach *Dunaliella tertiolecta* [57,58]. Autorzy wykazali, że inkubacja przez 12 godzin z 100 μM ZnCl_2 nie wpływała negatywnie na dalszy wzrost i rozwój glonów, a jednocześnie podnosiła ich tolerancję na obecność takich metali ciężkich, jak Cd, Hg, Cu i Pb, a także nadtlenku wodoru i parakwatu. Zhang i wsp. [75] wykazali, że niskocząsteczkowe fitochelatyny PC_2 mogą odgrywać istotną rolę w procesie detoksykacji As przez hiperakumulatory *Pteris vittata*. Autorzy przypuszczają jednakże, że system fitochelatynowy jest zaangażowany w chelatowanie i sekwestrację jonów As, natomiast nie wpływa na zdolność tych roślin do tak wysokiej tolerancji na obecność metalu.

Uważa się, że rośliny odporne na obecność metali ciężkich wykazują na ogół wyższy poziom fitochelatyn niż rośliny wrażliwe lub też proces syntezy PC przebiega u nich znacznie intensywniej, dzięki czemu jony metali są szybciej i bardziej efektywnie usuwane z cytoplazmy do nieaktywnych kompartmentów komórkowych, takich jak np. wakuola [18]. Jak do tej pory były prowadzone pilotażowe doświadczenia, w których do roślin lub bakterii wprowadzone zostały geny syntetazy γ -EC, syntazy fitochelatynowej oraz metalotionein [8,23,46,76]. Najnowsze dane na ten temat zostały zebrane w pracach przeglądowych Wasinkiewicza i wsp. [65] oraz Pilon-Smits i Pilon [39]. Mutanty, do których wprowadzono dodatkowe geny kodujące syntazę fitochelatynową, wykazywały znacznie wyższy poziom tolerancji na obecność kadmu, a także zwiększenie ilości pobranego i zakumulowanego metalu. Natomiast mutanty pozbawione genu syntazy PCs wykazywały bardzo dużą wrażliwość na kadm.

Przedostające się rokrocznie do środowiska zanieczyszczenia, ścieki, pyły i odpady przemysłowe wywołują realne zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania całych ekosystemów. Dotychczas stosowane metody usuwania zanieczyszczeń są bardzo kosztowne, wymagają wyszukanego sprzętu i powodują zanik na oczyszczanym terenie jakiegokolwiek aktywności życiowej [7,8,71]. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na możliwość wykorzystania roślin do usuwania lub inaktywacji zanieczyszczeń z gleby i wód powierzchniowych. W środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi można hodować rośliny, które wykazują dużą odporność na wysoki poziom metali tzw. metalofity lub też hiperakumulatory, tzn. rośliny gromadzące w suchej masie organów nadziemnych ponad 1% całej ilości pobranego przez roślinę metalu, co stanowi nawet 100 razy więcej niż w „normalnych” roślinach [25]. Najlepszymi akumulatorami Pb są: *Armeria maritima*, *Thlaspi rotundifolium*, *Thlaspi alpestre*, *Alyssum wulfenianum*. Duża część badań koncentruje się obecnie na takich roślinach, jak: *Brassica juncea*, *Zea mays* czy *Pisum sativum*, które charakteryzują się dość wysoką tolerancją na zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi i jednocześnie mają wysoki przyrost biomasy [10,21,43,72]. W celu podwyższenia ich zdolności transportowania i akumulowania metali w częściach nadziemnych stosuje się syntetyczne związki chelatujące, takie jak EDTA [11,38,70]. W innym kierunku idą badania nad przygotowaniem roślin zmienionych genetycznie, do których wprowadzane są geny umożliwiające pobieranie większej ilości metali, a zwłaszcza wspomagające ich transport do części nadziemnych [39].

Badania dotyczące tolerancji roślin na skażenie środowiska toksycznymi substancjami wydają się być podstawowymi dla intensywnie rozwijającej się dziedziny, jaką jest fitoremediacja. Poznanie mechanizmów zaangażowanych w pobieranie, translokację i detoksykację tych związków pomoże zaprojektować takie rośliny transgeniczne, które będą ważnym elementem ochrony środowiska.

LITERATURA

- [1] BARANOWSKA-MOREK A. Roślinne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich. *Kosmos* 2003; **52**: 283–298.
- [2] CAZALE AC, CLEMENS S. *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Letters* 2001; **507**: 215–219.
- [3] CLEMENS S. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TIPS* 2002; **7**: 309–315.
- [4] COBBETT CS, MAY MJ, HOWDEN R, ROLLS B. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1* of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant J* 1998; **16**: 73–78.
- [5] COBBETT CS. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 2000; **123**: 825–832.
- [6] CRUZ BH, DIAZ-CRUZ JM, DIAZ-CRUZ MS, ARIÑO C, ESTEBAN M, TAULER R. Differential pulse polarographic study of the Pb(II) complexation by glutathione. *J Electroanal Chem* 2001; **516**: 110–111.
- [7] CUNNINGHAM SD, BERTI WR. Phytoextraction and phytostabilization: technical economic, and regulatory considerations of the soil-lead issue. W: Terry N, Banuelos G. [red.] *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 2000: 359–376.
- [8] DIETZ AC, SCHNOOR, JL. Advances in phytoremediation. *Environ Health Perspect* 2001; **109**: 163–168.
- [9] DIXON DP, CUMMINS I, COLE DJ, EDWARDS R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1998; **1**: 258–266.
- [10] EBBS SD, KOCHIAN LV. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ Sci Technol* 1998; **32**: 802–806.
- [11] EPSTEIN AL, GUSSMAN CD, BLAYLOCK MJ, YERMIYAHU U, HUANG JW, KAPULNIK Y, ORSER CS. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant & Soil* 1999; **208**: 87–94.
- [12] FOYER CH, THEODOULOU FL, DELROT S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *TIPS* 2001; **6**: 486–487.
- [13] GEEBELEN W, VANGRONSVELD J, CLIJSTERS H. Some physiological aspects of lead phytotoxicity. Proc 5th Intern Conf On The Biogeochem of Trace Elements, Vienna, 1999: 1154–1155.
- [14] GRILL D, TAUSZ M, DE KOK LJ. Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. [red.] Grill D., Tausz M., De Kok, Kluwer Academic Publishers, Holandia, 2001: 1–50.
- [15] GWÓŹDŹ EA, PRZYMUSIŃSKI R, RUCIŃSKA R, DECKERT J. Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. *Acta Physiol Plant* 1997; **19**: 459–465.
- [16] GWÓŹDŹ EA. Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. W: Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. [red.] Barciszewski J, Łastowski K, Twardowski T. Sorus. Poznań, 1996: 462–492.
- [17] GWÓŹDŹ EA. Odporność na czynniki abiotyczne. W: *Biotechnologia roślin*. [red.] Malepszy S. PWN, Warszawa 2002: 375–390.
- [18] GWÓŹDŹ EA, KOPYRA M. Reakcje komórek roślinnych na metale ciężkie – aspekty biotechnologiczne. *Biotechnologia* 2003; **62**: 107–123.
- [19] HA SB, SMITH AP, HOWDEN R, DIETRICH WM, BUGG S, O'CONNELL MJ, GOLDSBROUGH PB, COBBETT CS. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast, *Schizosacharomyces pombe*. *Plant Cell* 1999; **11**: 1153–1164.

- [20] HALL JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1–11.
- [21] HUANG JW, BLAYLOCK MJ, KAPULNIK Y, ENSLEY BD. Phytoremediation of uranium-contaminated soils: Role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environ Sci Technol* 1998; **32**: 2004–2008.
- [22] KABATA-PENDIAS A, KABATA H. Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa, 1999: 53–240.
- [23] KRÄMER U, CHARDONNENS AN. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; **55**: 661–672.
- [24] KUBOTA H, SATO K, YAMADA T., MAITANI T. Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* 2000; **53**: 239–245.
- [25] KUMAR PBAN, DUSHENKOV V, MOTTO H, RASKIN I. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci Technol* 1995; **29**: 1232–1238.
- [26] LEOPOLD I, GUNTHER D, SCHMIT J, NEUMANN D. Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 1999; **50**: 1323–1328.
- [27] LEUSTEK T, SAITO K. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol* 1999; **120**: 637–643.
- [28] LIU D, JIANG W, LIU CH, XIN CH, HOU W. Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard. *Biores Technol* 2000; **71**: 273–227.
- [29] MAŁECKA A, TOMASZEWSKA B, JARMUSZKIEWICZ W. Antioxidative defence to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim Polon* 2001; **3**: 687–698.
- [30] MAŁKOWSKI E, KURTYKA R. Mechanizmy hyperakumulacji cynku i kadmu w roślinach. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 483–496.
- [31] MAY MJ, VERNOUX T, LEAVER C, VAN MONTAGU M, INZE D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing. *J Exp Bot* 1998; **49**: 649–667.
- [32] MEHRA RK, KODATI R, ABDULLAH R. Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatin. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; **215**: 730–738.
- [33] MOREL JL, BITTON G, SCHWARTZ C, SCHIAVON M. Bioremediation of soils and waters contaminated with micropollutants. (w) Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment. Zelikoff JT (red.), SOS Publications, Fair Haven, New York, USA, 1997: 37–74.
- [34] NOCTOR G, ARISI ACM, JOUANIN L, KUNERT KJ, RENNENBERG H, FOYER CHH. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* 1998; **49**: 624–631.
- [35] NOCTOR G, GOMEZ L, VANACKER H, FOYER CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1283–1304.
- [36] PIECHALAK A, KASIEŃSKA A, TOMASZEWSKA B, BARAŁKIEWICZ D. Response of legumes to lead ion stress. III Conference on Trace Metals. Effects on Organisms and Environment, Sopot 6–8 June 2000; 150 pp.
- [37] PIECHALAK A, TOMASZEWSKA B, BARAŁKIEWICZ D, MAŁECKA A. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 2002; **60**: 153–167.
- [38] PIECHALAK A, TOMASZEWSKA B, BARAŁKIEWICZ D. Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry* 2003; **64**: 1239–1251.
- [39] PILON-SMITS E, PILON M. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Crit Rev Plant Sci* 2002; **21**: 439–456.
- [40] RAUSER WE. Phytochelatin and related peptides. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1141–1149.
- [41] RENSING C, SUN Y, MITRA B, ROSEN BP. Pb(II)-translocating P-type ATPases. *J Biol Chem* 1998; **273**: 32614–32617.
- [42] RUCIŃSKA R, TUKIENDORF A, STROIŃSKI A, GWÓŹDŹ EA. Phytochelatin and antioxidant enzymes in lupin roots exposed to heavy metals. *Biol Bull* 1997; **34**: 50–51.
- [43] SALT DE, SMITH RD, RASKIN I. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 1998; **49**: 643–668.
- [44] SAMARDAKIEWICZ S, STRAWIŃSKI P, WOŹNY A. The influence of lead on callose formation in roots of *Lemna minor* L. *Biol Plant* 1996; **38**: 463–467.
- [45] SANITA DI TOPPI L, GABBRIELLI R. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 1999; **41**: 105–130.
- [46] SAUGE-MERLE S, CUINE S, CARRIER P, LECOMTE-PRADINES C, LUU DT, PELTIER G. Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 490–494.

- [47] SCARANO G, MORELLI E. Characterisation of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *BioMetals* 2002; **15**: 145–151.
- [48] SCHÄFER HJ, GREINER S, RAUSCH T, HAAG-KERWER A. In seedlings of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu²⁺ differentially affects transcript amounts for γ -glutamylcysteine synthetase (γ ECS) and metallothionein (MT2). *FEBS Letters* 1997; **404**: 216–220.
- [49] SEREGIN IV, IVANOV VB. The transport of cadmium and lead ions through root tissues. *Russ Plant Physiol* 1998; **45**: 780–785.
- [50] SHI ZZ, OSEI-FRIMONG J, KALA G, KALA SV, BARRIOS RJ, HABIB GM, LUKIN DJ, DANNEY CM, MATZUK MM, LIEBERMAN MW. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 5101–5106.
- [51] SOLIOZ M, VULPE C. CPx-type ATP-ases: a class of P-type ATP-ases that pump heavy metals. *TIBS* 1996; **21**: 237–241.
- [52] STORHM M, JOUANIN L, KUNNERT KJ, PRUVOST C, POLLE A, FOYER CH, RENNENBERG H. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transformed poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) over-expressing glutathione synthetase. *Plant J* 1995; **7**: 141–145.
- [53] STROIŃSKI A. Odporność roślin na stres wywołany przez metale ciężkie. *Biotechnologia* 2003; **3**(58): 124–134.
- [54] SZE H, LI X, PALMGREN MG. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 1999; **11**: 677–689.
- [55] TOMASZEWSKA B, TUKIENDORF A, BARAŁKIEWICZ D. The synthesis of phytochelatin in lupin roots treated with lead ions. *Sci Legumes* 1996; **3**: 206–217.
- [56] TOMASZEWSKA B. Glutathione and thiol metabolism in metal exposed plants. (eds.) Prasad MNV., Strzałko K., Physiology and Biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Acad Publishers, Holandia, 2002: 37–58.
- [57] TSUJI N, HIRAYANAGI N, IWABE O, NAMBA T, TAGAWA M, MIYAMOTO S, MIYASAKA H, TAKAGI M, HIRATA K, MIYAMOTO K. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 2003; **62**: 453–459.
- [58] TSUJI N, HIRAYANAGI N, OKADA M, MIYASAKA H, HIRATA K, ZENK MH, MIYAMOTO K. Enhanced of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *BBRC* 2002; **293**: 653–659.
- [59] TURNAU K, JURKIEWICZ A, GRZYBOWSKA B. Rola mikorzyzy w bioremediacji terenów zanieczyszczonych. *Kosmos* 2002; **51**: 185–194.
- [60] VATAMANIUK OK, BUCHER AE, WARD TJ, REA PA. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. *J Biol Chem* 2001; **276**: 20817–20820.
- [61] VATAMANIUK OK, BUCHER AE, WARD TJ, REA PA. Worms take the „phyto“ out of „phytochelatin“. *TIBS* 2002; **20**: 61–64.
- [62] VATAMANIUK OK, MARI S, LU YP, REA PA. AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vivo* reconstruction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7110–7115.
- [63] VATAMANIUK OK, MARI S, LU YP, REA PA. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 31451–31459.
- [64] VERNOUX T, WILSON RC, SEELEY KA, REICHHELD RP, MUROY S, BROWN S, MAUGHAN SC, COBETT CS, VAN MONTAGU M, INZED, MAY MJ, SUNG ZR. The *root meristemless1/Cd sensitive2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance on cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 2000; **12**: 97–109.
- [65] WASINKIEWICZ K, WOJTERA J, TOMASZEWSKA B. Transformacje roślin w celu ich zastosowania w fitoremediacji. *Biotechnologia* 2003; **4**(64): 108–126.
- [66] WIERZBICKA M. Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. *Environ Exp Bot* 1989; **29**: 123–133.
- [67] WIERZBICKA M. Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. roots tips – ultrastructural studies. *Plant Sci* 1998; **133**: 105–119.
- [68] WILLIAMS LE, PITTMAN JK, HALL JL. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Bioch Biophys Acta* 2000; **1463**: 104–126.
- [69] WOŹNY A, KRZESŁOWSKA M, TOMASZEWSKA B. W: Woźny A. (red.) Ołów w komórce roślinnej. Sorus, Poznań, 1995: 21–110.
- [70] WÓJCİK M, TUKIENDORF A. The effect of EDTA on maize seedlings response to Cd-induced stress. *Z Naturforsch* 1999; **54c**: 754–758.

- [71] WÓJCIK M. Fitoremediacja – sposób oczyszczania środowiska. *Kosmos* 2001; **49**: 135–147.
- [72] WU J., HSU FC, CNNINGHAM SD. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation constraints. *Environ Sci Technol* 1999; **33**: 1898–1904.
- [73] XIANG CB, OLIVER DJ. Glutathione metabolic genes co-ordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998; **10**, 1539–1550.
- [74] ZENK MH. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 1996; **179**: 21–30.
- [75] ZHANG W., CAI Y., DOWNUM K.R., MA L.Q. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Environmental Pollution* 2004; **131**: 337–345.
- [76] ZHU YL, PILON-SMITH EAH, JOUANIN L, TERRY N. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances Cd²⁺ accumulation and tolerance. *Plant Physiol* 1999; **119**: 73–79.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 21.11.2003 r.

Przyjęto: 08.10.2004 r.

Zakład Biochemii UAM,

ul. Fredry 10, 61-701 Poznań,

e-mail: anetap@amu.edu.pl

WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI

WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI
WYKAZ PRACOWNIKÓW I PRACOWNICZYNI

PODŁOŻE MOLEKULARNE ZESPOŁU NIJMEGEN*

MOLECULAR GENETICS OF NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME

Maria MOSOR¹, Danuta JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA^{1,2}

¹Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, ²Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, Akademia Medyczna, Poznań

Streszczenie: Zespół niestabilności chromosomowej Nijmegen (NBS, OMIM 251260) jest rzadko występującą jednostką chorobową. Schorzenie wydaje się być typowe dla regionu Europy Środkowej i Wschodniej. Tylko w Polsce zarejestrowano 81 spośród około 140 przypadków opisanych na świecie. Podstawowe objawy kliniczne to małogłowie, zaburzenia wzrostu, niedobór odporności. Zespołowi temu towarzyszy zwiększona predyspozycja do rozwoju nowotworów złośliwych w młodym wieku. Zespół Nijmegen jest dziedziczony w sposób autosomalnie recesywny. Za rozwój zespołu NBS odpowiadają germinalne mutacje genu *NBS1*. Najczęstszą z mutacji jest delecja 5pz (657del5) w egzonie 6 genu *NBS1*. Mutacja ta zwana słowiańską występuje u 90% pacjentów z zespołem NBS. Mutacje genu *NBS1* wpływają na zaburzenia w funkcjonowaniu jego produktu białkowego – nibryny wchodzącej w skład kompleksu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA – MRE11/RAD50/Nibryna (M/R/N). Stąd też komórki pacjentów z NBS wykazują spontaniczną niestabilność chromosomową oraz zaburzenia cyklu komórkowego będące wynikiem wrażliwości na promieniowanie jonizujące i radiomimetyki.

Słowa kluczowe: zespół niestabilności chromosomowej Nijmegen, gen *NBS1*, nibryna.

Summary: The chromosomal instability disorder, Nijmegen Breakage Syndrome (NBS, OMIM 251260) is a rare disease with perhaps 140 cases world-wide. They are mostly of eastern and central European origin, especially Polish – 81 cases. The clinical picture is characterized by microcephaly, growth retardation and immunodeficiency. High incidence of malignancies at early childhood is striking hallmarks of NBS. Inheritance of NBS follows an autosomal recessive trait. The disease is caused by mutations in *NBS1* gene. A truncating 5bp deletion (657del5) in exon 6 of the *NBS1* gene has been identified in 90% of NBS patients. All known disease-causing mutations result in premature truncation of the nibrin – product of the *NBS1* gene. Nibrin is a member of the MRE11/RAD50 protein complex involved in the repair of DNA double-strand breaks. Cells from NBS patients show chromosomal instability and cellular checkpoints defects as a marked sensitivity to ionizing irradiation and radiomimetic agents.

Key words: chromosomal instability Nijmegen Breakage Syndrome, *NBS1* gene, nibrin.

*Praca finansowana ze środków MNiI w ramach realizacji projektów: PBZ KBN 090/P05/02 oraz PBZ KBN 090/P05/2003.

HISTORIA BADAŃ GENU *NBS1*

Zespół niestabilności chromosomowej NBS opisano po raz pierwszy w roku 1979 [20]. Pacjentem był chłopiec z upośledzeniem umysłowym, małą głową, zaburzeniem wzrostu, plamami na skórze typu *cafe-au-lait* oraz niedoborem odporności. Na podstawie analizy cytogenetycznej zidentyfikowano rearanżacje chromosomów 7 i 14. Większość translokacji występowała w obrębie prążków 7p13, 7q32 oraz 14q11. Badania przeprowadzone u rodzeństwa pacjenta z podobnymi objawami pozwoliły na dokładniejszy opis nieznannej wówczas jednostki chorobowej [49]. Cztery lata później Seemanova i wsp. [39] opisali 9 przypadków z sześciu rodzin z nową, uwarunkowaną genetycznie jednostką chorobową dziedziczną w sposób autosomalnie recesywny. W grupie tej zaobserwowano podobne objawy jak w wyżej wymienionych przypadkach: niską masę urodzeniową, małą głowę, upośledzenie odporności komórkowej i humoralnej oraz zwiększoną częstość występowania chłoniaka w tych rodzinach. Maraschio i wsp. [28] opisali przypadek 31-letniej kobiety z objawami klinicznymi przypominającymi zespół NBS. Analiza cytogenetyczna wykazała szereg aberracji chromosomowych. Ponad połowa (59%) chromosomów metafazowych wykazywała niezrównoważoną translokację t(8q;21q) oraz rearanżacje chromosomów 7 i 14 podobne do zmian opisywanych u pacjentów z ataksją telangiektazją (AT).

Komórki pacjentów z NBS, podobnie jak komórki pacjentów z AT wykazują spontaniczną niestabilność chromosomową, nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące oraz radio-oporność syntezy DNA. Na tej podstawie w połowie lat 80 przypuszczano, iż zespoły AT i NBS mogą być wywoływane mutacjami tego samego genu [10,43]. Przez prawie 10 lat zespół NBS był określany jako jeden z wariantów AT (AT-V). W roku 1988 na podstawie analizy komplementacji komórek zaproponowano rozróżnienie dwóch odrębnych grup chorych, tj. AT-V1 z zespołem niestabilności typu Nijmegen (NBS – ang. *Nijmegen breakage syndrome*) i AT-V2 z zespołem niestabilności typu Berlin (BBS – ang. *Berlin breakage syndrome*) [22,50]. Analiza sprzężeń przeprowadzona wśród członków sześciu rodzin z zespołem NBS wykluczyła sprzężenie genu odpowiedzialnego za rozwój tego zespołu z regionem 11q23.1 [41], w którym znajduje się locus genu *ATM* [17]. Dokładna analiza wszystkich chorych ostatecznie potwierdziła, iż NBS jest odrębną jednostką chorobową niealleliczną z AT [38,46]. Stumm i wsp. [42] wykorzystując indukcję aberracji chromosomowych potwierdzili brak komplementacji hybryd komórkowych AT/NBS. Jednak pełne wyjaśnienie mogło przynieść tylko zmapowanie genu, którego mutacje są odpowiedzialne za powstanie zespołu NBS. Stosując analizę sprzężeń i haplotypów przy użyciu markerów obejmujących miejsca pęknięć na chromosomach 3 i 7 u członków 12 rodzin z t(3;7)(q12;q31.3) ostatecznie wykluczono istnienie genu związanego z rozwojem zespołu w regionach pęknięć tych chromosomów [9]. Saar i wsp. [37] przeprowadzili analizę sprzężeń u 14 rodzin chorych z NBS/BBS i zlokalizowali gen z dokładnością do 1 cM na chromosomie 8q21 między markerami D8S271 i D8S270 z wartością wskaźnika LOD 6,86 w D8S1811. Analiza sprzężeń była wysoce informatywna ze

względem na występowanie mutacji założycielskiej (ang. *founder mutation*), która u większości badanych występowała w układzie homozygotycznym. Od momentu zidentyfikowania tego samego allelu u pacjentów z NBS i BBS potwierdzono homogenność genetyczną obu tych grup. Analiza sprzężeń przeprowadzona w rodzinach NBS z różnych rejonów geograficznych potwierdziła sprzężenie z chromosomem 8q21 u 6 z 7 badanych rodzin [8].

GEN *NBS1*

Dopiero w roku 1998 trzy niezależne grupy badawcze zidentyfikowały gen *NBS1*. Varon i wsp. [47] przy pomocy klonowania pozycyjnego zmapowali gen *NBS1* na chromosomie 8q21 oraz zidentyfikowali nibrynę jako produkt białkowy genu *NBS1*. Carney i wsp. [5] przeprowadzając analizę biochemiczną białkowego kompleksu MRE11/RAD50, uczestniczącego w naprawie dwuniciowych pęknięć nici DNA, opisali białko p95 jako składnik tego kompleksu. Białko p95 jest produktem genu zmapowanego na chromosomie 8 w regionie q21.3, w locus NBS. Porównanie cDNA p95 z cDNA *NBS1* [47] potwierdziło homologię obu sekwencji. W tym samym czasie Matsuura i wsp. [31] przy użyciu klonowania pozycyjnego potwierdzili obecność genu *NBS1* na chromosomie 8q21.3.

BUDOWA I LOKALIZACJA GENU *NBS1*

Gen *NBS1* znajduje się na chromosomie 8 w regionie q21.13-q21.3. Gen ten zbudowany jest z 16 eksonów i wraz z dzielącymi je intronami zajmuje 50,6 kpz genomowego DNA. Wielkość poszczególnych eksonów wynosi średnio 150 pz, przy czym najmniejszym eksonem jest ekson 15 (50 pz), a największym 11 (448 pz).

Gen *NBS1* ulega ekspresji we wszystkich dotąd przebadanych tkankach. Podczas analizy *Northern Blot* (mRNA z 16 różnych tkanek) zaobserwowano dwa sygnały świadczące o istnieniu dwóch transkryptów różnej długości, tj. 2,4 i 4,4 kpz, które stanowią produkty alternatywnego składania genu [47]. W obu przypadkach produktami są białka zbudowane z 754 aminokwasów, pełniące tę samą funkcję. Oba transkrypty mają ten sam kodon *start*, zlokalizowany w eksonie 1, ale istnieją dwa różne sygnały poliadenylacji, występujące w eksonie szesnastym odpowiednio w regionach 2446-2251 i 4392-4397. Nie można jednoznacznie stwierdzić, czy alternatywne składanie jest tkankowo specyficzne. Transkrypt 4,4 kpz dominuje w większości tkanek. Dwukrotnie większą ilość obu transkryptów obserwuje się w śledzionie, jądrach i jajnikach [31,47].

TABELA 1. Długość eksonów genu *NBS1*

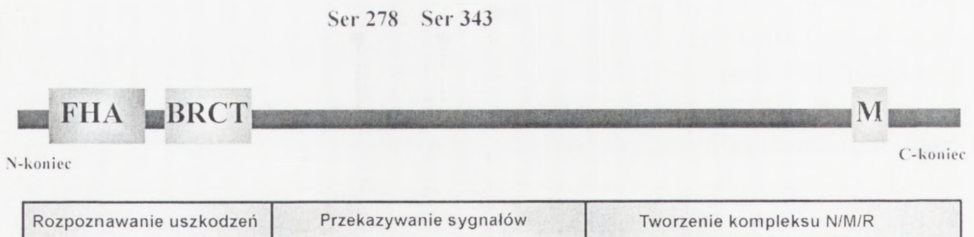
Ekson	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pz	59	134	149	160	104	118	194	98	130	273	448	69	156	114	50	181

BUDOWA I FUNKCJA BIAŁKA NIBRYNY

Produktem genu *NBS1* jest białko o masie 85 kDa zwane nibryną, które wchodzi w skład białkowego kompleksu MRE11/RAD50/nibryna (M/R/N) [5,47]. Białko to występuje również pod nazwą p95 [5]. Nibryna zbudowana jest z 754 aminokwasów i wykazuje słabą homologię (46%) do drożdżowego białka Xrs2 w obszarze pierwszych 115 aminokwasów [5]. W obrębie 200 reszt aminokwasowych końca aminowego znajdują się dwie funkcjonalne domeny: FHA (ang. *forkhead associated domain*) tworząca odcinek 24–100 reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego i karboksylowa domena BRCT (ang. *breast cancer carboxyterminal domain*) obejmująca 114–182 reszt aminokwasowych [2,15,19,47]. Na końcu karboksylowym nibryny znajduje się domena wiążąca MRE11 (665–693 reszt aa) [11]. W regionie centralnym cząsteczki nibryny znajdują się miejsca fosforylacji, np. Ser278 i Ser343, katalizowane przez kinazę ATM.

Większość białek zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego, replikację lub naprawę DNA ma domeny FHA albo BRCT, ale jednocześnie występowanie obu tych domen w jednym białku jest unikalne dla nibryny [13]. Domena FHA bierze udział w fosfo-serynowo-treoninowo swoistych oddziaływaniach pomiędzy łańcuchami białkowymi (ang. *phospho-ser/thr-specific interaction*), np. homodimeryzacji ufosforylowanego białka Chk2 oraz fosfozależnych oddziaływaniach Rad53 i Rad9 [13]. Domena BRCT bierze udział w oddziaływaniu p53- supresora nowotworów z ligazą DNA lub białkiem XRCC1 [4]. Domeny FHA i BRCT pełnią kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu kompleksu M/R/N [6,55]. Mutacje konserwatywnych reszt aminokwasowych obu domen nie wpływają na tworzenie oraz jądrową lokalizację tego kompleksu, uniemożliwiają natomiast formowanie skupisk jądrowych. Prawidłowe funkcjonowanie domen FHA i BRCT jest niezbędne dla fosforylacji nibryny w pozycji Ser343 po napromieniowaniu.

Nibryna pełni istotną funkcję w utrzymywaniu integralności genomu uczestnicząc w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (ang. *DSBs-double strand breaks*) [5]. DSBs są jednymi z najpoważniejszych uszkodzeń DNA, dlatego też zaburzenia mechanizmów ich naprawy prowadzą do niestabilności genomu charakteryzującej m.in.

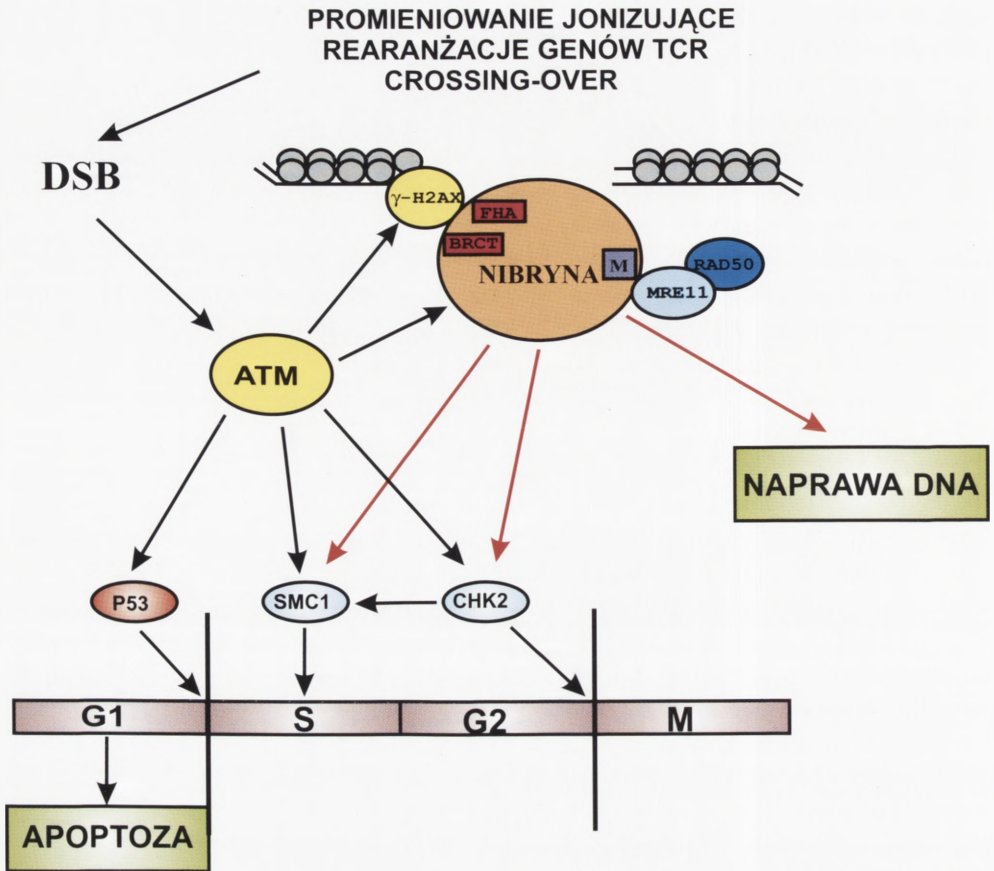


RYCINA 1. Schemat cząsteczki nibryny uwzględniający lokalizację domen FHA i BRCT, miejsce wiązania MRE11 oraz dwóch reszt serynowych fosforylowanych przez ATM

zespół NBS. DSBs powstają w wyniku działania zewnętrznych czynników destrukcyjnych, np. promieniowania jonizującego, ale także towarzyszą rearanżacji genów receptorów limfocytów T, stabilizacji telomerów oraz homologicznej rekombinacji podczas mejozy. Interakcje szeregu białek, np. ATM, nibryna, H2AX, MRE11, Rad 50 i innych, warunkują prawidłową odpowiedź komórki na uszkodzenie DNA. Sugeruje się, że podobny fenotyp komórek pozyskanych od chorych z AT i NBS jest wyrazem nieprawidłowego funkcjonowania białka ATM oraz kompleksu M/R/N.

Produkt autofosforylacji białka ATM (ryc. 2), zachodzącej w prawidłowych komórkach pod wpływem promieniowania jonizującego, katalizuje fosforylację szeregu substratów, w tym nibryny i histonu H2AX [1,3,16,24,47,56]. Nibryna jest przemieszczana do miejsca dwuniciowego pęknięcia DNA dzięki bezpośredniej interakcji domen FHA i BRCT i ufosforylowanego histonu H2AX. Również białka MRE11 i RAD50, związane z domeną zlokalizowaną w obrębie końca karboksylowego nibryny, są przemieszczane z cytoplazmy do jądra komórkowego do miejsca uszkodzenia DNA [5,21]. Powstały kompleks białkowy tworzy skupiska jądrowe. Nibryna fosforyluje MRE11 rozpoczynając w ten sposób rozwijanie nici DNA [12]. Kompleks M/R/N ma aktywność pojedynczoniciowej endonukleazy DNA i egzonukleazy 3'→5'. Świadczy to o jego bezpośrednim udziale w przygotowaniu końców DNA do ponownego łączenia [35,45]. Prawidłowa odpowiedź komórki na promieniowanie jonizujące jest związana z uruchamianiem punktów kontroli cyklu komórkowego. Wejście w fazę S cyklu komórkowego jest regulowane poprzez dwa równoległe szlaki, przy czym jeden z nich angażuje białka ATM, nibrynę i SMC1 [14,54]. Białko ATM fosforylując reszty aminokwasowe nibryny np. Ser278, Ser343 przygotowuje białko do udziału w prawidłowej odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące [16,24,56]. Fosforylacja Ser 343 *in vivo* jest niezbędna w procesie fosforylacji substratów kinazy ATM, w tym Chk2, SMC1 i FANCD [3,33,54]. Nibryna jest nie tylko substratem kinazy ATM, ale wpływa także na jej aktywność w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [23]. Warunkuje także aktywację białka Chk2 zależnego od ATM. Sugeruje się, że aktywny kompleks M/R/N wpływa na strukturę ATM zwiększając powinowactwo do jego substratów.

Uszkodzony produkt białkowy genu NBS1 powoduje u ludzi chorych dysfunkcję mechanizmów ochrony komórki. Zaburzenia w funkcjonowaniu punktów kontroli cyklu komórkowego prowadzą do błędów w naprawie i replikacji DNA, a tym samym do niestabilności genomu. Tauchi i wsp. [44] badając linie komórek z wyłączonym genem NBS1 wykazali, iż nibryna jest niezbędna w procesach naprawczych typu rekombinacja homologiczna w komórkach wyższych kręgowców. Nibryna jako składnik kompleksu M/R/N bierze również udział w stabilizacji telomerów. Nibryna i MRE11 są obecne na telomerach podczas mejozy u ssaków, analogicznie jak ich homologi w komórkach drożdży [25,51]. Niewielkie frakcje kompleksu M/R/N są zlokalizowane w obrębie TRF2 (ang. *telomeric repeat-binding factor*) [58]. RAD50 i MRE11 są obecne na telomerach interfazy, natomiast nibryna tylko w fazie S cyklu komórkowego. Kompleks M/R/N prawdopodobnie uczestniczy w tworzeniu struktury *t-loop*.



RYCINA 2. Schemat udziału cząsteczki nibryny podczas odpowiedzi komórki na obecność podwójnych pęknięć DNA (DSB – ang. *double strand break*). Pojawienie się DSB aktywuje białko ATM, które rozpoczyna fosforylację swych substratów, w tym histonu H2AX oraz nibryny. Nibryna jest przemieszczana do miejsca DSB i wraz z MRE11 oraz RAD50 tworzy kompleks odpowiedzialny za naprawę DSB. Nibryna bierze również udział w kontroli cyklu komórkowego w odpowiedzi na DSB poprzez uczestnictwo w ATM-zależnej kaskadzie prowadzącej do blokady cyklu komórkowego w punktach G1/S, G2/M oraz supresji syntezy DNA

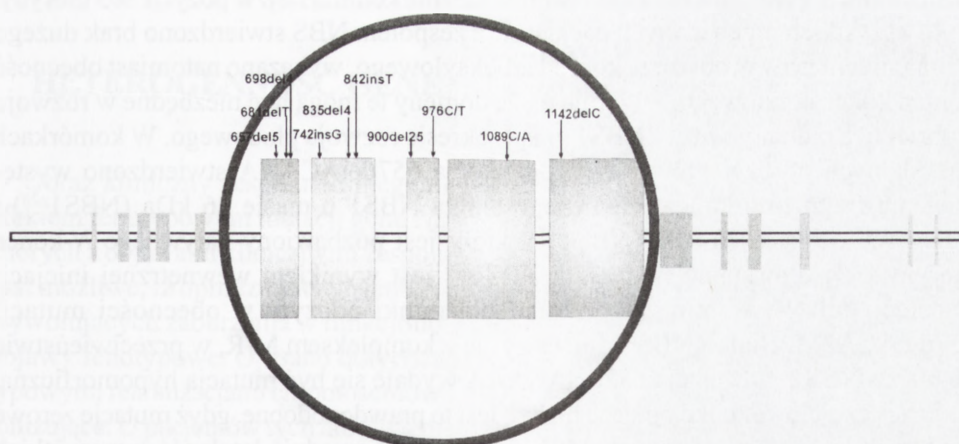
Wszystkie wspomniane doniesienia wskazują na kluczową rolę nibryny w odpowiedzi komórki na dwuniciowe pęknięcia DNA, rekombinacji homologicznej oraz stabilizacji telomerów.

MOLEKULARNE INTERAKCJE NIBRYNY Z INNYMI BIAŁKAMI

Kompleks M/R/N wchodzi w interakcje z białkiem BRCA1 pełniącym istotną funkcję w utrzymywaniu integralności genomu [48,57]. Fizjologiczna aktywność białka BRCA1 warunkuje właściwą odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA regulowaną przez kompleks M/R/N [57]. Kompleks M/R/N, BRCA1, białka supresyjne, przekaźniki sygnałów oraz białka rozpoznające uszkodzenia DNA tworzą większy kompleks białkowy BACS (ang. *BRCA1-associated genome surveillance complex*) [48]. Kompleks ten tworzy duże skupiska jądrowe. Wysunięto hipotezę, iż BACS bierze udział w identyfikacji zaburzeń struktury DNA i/lub pełni funkcje regulacyjną poreplikacyjnych procesów naprawczych.

MUTACJE I POLIMORFIZMY GENU *NBS1*

Zespół niestabilności chromosomowej NBS jest wynikiem szeregu germinalnych mutacji w genie *NBS1*. Mutacje te występują zarówno w układzie homozygotycznym, jak i heterozygotycznym (ang. *compound mutations*). Do tej pory wykryto 9 mutacji w genie *NBS1* związanych z rozwojem zespołu Nijmegen (tab. 2) [27,33,36,47]. Zlokalizowane w eksonach 6–10 mutacje są odpowiedzialne za przedwczesną terminację transkryptu nibryny jako efekt przesunięcia ramki odczytu lub wprowadzenia kodonu *stop*. Skrócony



RYCINA 3. Schemat genu *NBS1* oraz lokalizacji mutacji związanych z rozwojem zespołu NBS

TABELA 2. Allele genu *NBS1* zidentyfikowane u chorych z zespołem NBS

Mutacja	Ekson	Efekt	Pochodzenie	Liczba
657del	6	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop X234	słowiańskie	>90%
5681delT	6	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop X230	rosyjskie	1
698de4	6	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop X237	angielskie	1
742insGG	7	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop X252	włoskie	1
835de4	7	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop X280	włoskie	1
842insT	7	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop X284	meksykańskie	1
900del25	8	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop	afrykańskie	2
976C>T	8	X306Q326X	holenderskie	1
1089C>A	9	Y363X	–	1
1142delC	10	przesunięcie ramki odczytu, kodon stop X403	kanadyjskie	2

TABELA 3. Lokalizacja miejsc polimorficznych w genie *NBS1*

Polimorfizm	Zmieniony nukleotyd	Ekson	Efekt
102 G/A	G/A	2	L34L
553 G/C	G/C	5	E185Q
IVS5+9T/C	T/C	IVS5	–
IVS5+51delT	delT	IVS5	–
IVS9+18C/T	C/T	IVS9	–
1197 T/C	T/C	10	D399D
IVS12-7A/G	A/G	IVS12	–
2016 A/G	A/G	13	P672P

produkt białkowy genu jest w większości przypadków pozbawiony C-końca, co uniemożliwia jego oddziaływanie z białkiem MRE11 i tworzenie kompleksu M/R/N.

Mutacja słowiańska (661-657del-ACAAA) występując w postaci homozygotycznej u ponad 90% pacjentów z NBS tworzy słowiański haplotyp, co sugeruje efekt założyciela tej mutacji [47]. Pozostałe mutacje (tab. 2) dotyczą pojedynczych przypadków pochodzących z różnych grup etnicznych. Mutację punktową 1089C>A w eksonie 9 genu *NBS1* zidentyfikowano u pacjenta z anemią

Fanconiego, u którego stwierdzono wcześniej występowanie dodatkowych objawów klinicznych charakteryzujących zespół NBS [33]. Homozygotycznie występująca u niego mutacja punktowa powoduje wprowadzenie kodonu *stop* w pozycji 363 nibryny.

U wszystkich przebadanych pacjentów z zespołem NBS stwierdzono brak dużego fragmentu nibryny w obszarze końca karboksylowego, wykazano natomiast obecność domen końca aminowego. Sugeruje to, że domeny te mogą być niezbędne w rozwoju embrionu, a mutanty *zerowe* *NBS1* giną w okresie rozwoju płodowego. W komórkach pozyskanych od pacjentów z NBS z mutacją 657delACAAA stwierdzono występowanie fragmentu końca aminowego białka *NBS1* o masie 26 kDa (*NBS1*^{p26}) i fragmentu o masie 70 kDa (*NBS1*^{p70}), który jest pozbawiony natywnego *N*-końca nibryny [30]. Powstanie fragmentu *NBS1*^{p70} jest wynikiem wewnętrznej inicjacji translacji mRNA w miejscu przesunięcia ramki odczytu w obecności mutacji 657delACAAA. Białko *NBS1*^{p26} nie łączy się z kompleksem M/R, w przeciwieństwie do białka *NBS1*^{p70}. Mutacja 657delACAAA wydaje się być mutacją hypomorficzną, kodującą częściowo funkcjonujące białko. Jest to prawdopodobne, gdyż mutacje *zerowe* (ang. *null mutations*) w genach *MRE11* i *RAD50* powodują letalność u wszystkich kręgowców [26,52,53].

W genie *NBS1* zidentyfikowano także szereg miejsc polimorficznych (tab. 3).

EFEKT ZAŁOŻYCIELA MUTACJI 657del5 W EKSONIE 6 GENU *NBS1*

W celu identyfikacji genu *NBS1* wykorzystano analizę zaburzeń równowagi sprzężeń. Badania te dotyczyły przede wszystkim populacji Europy Środkowej (polskiej, czeskiej i niemieckiej) [47]. Zaburzenia równowagi sprzężeń i występowanie konserwatywnego haplotypu dotyczy głównie populacji małych i zasiedlających nowe terytoria. W przypadku populacji polskiej i czeskiej nie są znane jakiegokolwiek bariery geograficzne, kulturowe czy też religijne, które doprowadziłyby do odizolowania którejs z nich. Wszyscy pacjenci z tych populacji są nosicielami mutacji 657delACAAA, co sugeruje jej słowiańskie pochodzenie.

Lokalizacja najczęstszej mutacji genu *NBS1* w obrębie specyficznego haplotypu u pacjentów z Niemiec i Danii jest świadectwem na rozprzestrzenianie się mutacji jako efektu migracji i daje podstawę do uznania jej za mutację założycielską (ang. *founder mutation*) [37,47]. Mutacja ta pojawiła się prawdopodobnie w chromosomie założyciela (ancestralnym) w charakterystycznym układzie sąsiednich polimorficznych alleli i wraz z całym segmentem upowszechniła się w populacjach słowiańskich. Przyczyną powstawania takich mutacji jest efekt założyciela będący wynikiem dryfu genetycznego. Rzadkie występowanie procesu *crossing-over* między mutacją determinującą fenotyp i zlokalizowanymi w pobliżu polimorficznymi *loci* powoduje zaburzenie równowagi sprzężeń, a upowszechnienie się ancestralnego haplotypu dopełnia obrazu efektu założyciela.

Wśród pacjentów z zespołem NBS będących nosicielami mutacji słowiańskiej zaburzenie równowagi sprzężeń jest możliwe do wykrycia w odległości 0,5 cM (1,5–2 Mpz) od genu *NBS1*. Świadczy to o stosunkowo krótkim okresie istnienia tej mutacji. Mutacja słowiańska genu *NBS1* w porównaniu np. z mutacją dF508 genu *CFTR* (mukowiscydoza) [32] ma ograniczony zasięg występowania w ogólnej populacji, co wyklucza selekcyjną przewagę heterozygot [47].

HETEROGENNOŚĆ GENETYCZNA ZESPOŁU NIJMEGEN

Obraz kliniczny zespołu Nijmegen w zdecydowanej większości przypadków jest efektem fenotypowym mutacji genu *NBS1*. Do tej pory opisano niewiele przypadków chorych z objawami klinicznymi zespołu NBS, ale nie mających mutacji w genie *NBS1*. Jest możliwe, iż oprócz mutacji genu *NBS1* mogą występować mutacje innych genów wywołujących zaburzenia w funkcjonowaniu nibryny, dając tym samym łagodniejsze objawy fenotypowe. Opisano dotychczas dwa przypadki chorych o fenotypie NBS z typowymi rearanżacjami chromosomów 7 i 14 oraz nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące. U pacjentów tych nie stwierdzono mutacji w genie *NBS1*, a stopień ekspresji produktu białkowego był prawidłowy [7,18]. Wyniki te sugerują istnienie mutacji w innym genie lub genach, dających objawy fenotypowe podobne do zespołu NBS (ang.

NBS-like phenotypes). Podobne zjawisko występuje u pacjentów z zespołem niestabilności chromosomowej AT. Znane są przypadki pacjentów z fenotypem podobnym do zespołu AT niebędących nosicielami mutacji w genie *ATM* (ang. *AT-like patients*). U niektórych z nich zidentyfikowano mutacje w genie *MRE11* [40]. Taki fenotyp charakteryzuje się łagodnymi objawami zespołu AT i został nazwany zaburzeniem podobnym do zespołu ataksji telangiektazji (ang. *ataxia telangiectasia-like disorder*, ATLD).

O'Driscoll i wsp. [34] opisali cztery przypadki pacjentów z klinicznymi objawami zespołu NBS. Analiza DNA tych chorych wykazała obecność mutacji w genie ligazy IV DNA (*LIG4*) wobec prawidłowej sekwencji genu *NBS1*. Zespół został wyodrębniony jako odrębna jednostka chorobowa – zespół *LIG4*, której fenotyp (OMIM 606593) jest wynikiem uszkodzenia specyficznego systemu rekombinacji DNA. Linie komórkowe pozyskane od pacjentów z zespołem *LIG4* wykazują wysoką wrażliwość na promieniowanie jonizujące. W przeciwieństwie do komórek NBS w komórkach *LIG4*, mimo iż rekombinacja DNA nie przebiega prawidłowo, występuje zablokowanie cyklu komórkowego. Podobieństwo objawów klinicznych obu zespołów wskazuje na kluczową rolę nibryny w naprawie dwuniciowego DNA, a fenotyp NBS jest bardziej wynikiem uszkodzeń systemu naprawy DNA aniżeli cyklu komórkowego.

Niedawno opisano kolejny przypadek pacjenta z objawami klinicznymi zespołu NBS [29]. Nie wykryto u niego mutacji w genach *NBS1* i *LIG4*. Analiza fenotypu komórek potwierdziła niestabilność chromosomową oraz wrażliwość na promieniowanie jonizujące. Stwierdzono natomiast prawidłowe funkcjonowanie punktów kontroli cyklu komórkowego.

Występowanie fenotypu charakterystycznego dla zespołu niestabilności chromosomowej NBS wobec prawidłowej struktury pierwszorzędowej genu *NBS1* sugerować może heterogenność genetyczną tej jednostki chorobowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BURMA S, CHEN BP, MURPHY M, KURIMASA A, CHEN DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001; **276**: 42462–42467.
- [2] BORK P, HOFMAN K, BUCHER P, NEUWALD AF, ALTSCHUL SF, KOONIN EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* 1997; **11**: 68–76.
- [3] BUSCEMI G, SAVIO C, ZANNINI L, MICCICHE F, MASNADA D, NAKANISHI M, TAUCHI H, KOMATSU K, MIZUTANI S, KHANNA K, CHEN P, CONCANNON P, CHESSA L, DELIA D. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2001; **15**: 5214–5222.
- [4] CALLEBAUT I, MORNON JP. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 1997 Jan 2; **400**(1): 25–30.
- [5] CARNEY JP, MASER RS, OLIVARES H, DAVIS EM, LE BEAU M, YATES JR 3RD, HAYS L, MORGAN WF, PETRINI JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998 May 1; **93**(3): 477–486.
- [6] CEROSALETTI KM, CONCANNON P. Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation. *J Biol Chem* 2003 Jun 13; **278** (24): 21944–21951. Epub 2003 Apr 04.

- [7] CEROSALETTI KM, DESAI-MEHTA A, YEO TC, KRAAKMAN-VAN DER ZWET M, ZDZIENICKA MZ, CONCANNON P. Retroviral expression of the NBS1 gene in cultured Nijmegen breakage syndrome cells restores normal radiation sensitivity and nuclear focus formation. *Mutagenesis* 2000; **15**(3): 281–286.
- [8] CEROSALETTI KM, LANGE E, STRINGHAM HM, WEEMAES CMR, SMEETS D, SOLDER B, BELOHRADSKY BH, TAYLOR AM, KARNES P, ELLIOT A, KOMATSU K, GATTI RA, BOEHNKE M, CONCANNON P. Fine localization of the Nijmegen breakage syndrome gene to 8q21: evidence for common founder haplotype. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 125–134.
- [9] CHRZANOWSKA K, STUMM M, BIALECKA M, SAAR K, BERNATOWSKA-MATUSZKIEWICZ E, MICHALKIEWICZ J, BARSZCZ S, REIS A, WEGNER RD. Linkage studies exclude the AT-V gene(s) from the translocation breakpoints in an AT-V patient. *Clin Genet* 1997 May; **51**(5): 309–313.
- [10] CURRY CJR, TSAI J, HUTCHINSON HT, JASPERS NGJ, WARA D, GATTI RA. AT(Fresno): a phenotype linking ataxia-telangiectasia with Nijmegen Breakage syndrome. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 270–275.
- [11] DIGWEED M, REIS A, SPERLING K. Nijmegen Breakage Syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *BioEssays* 1999; **21**: 649–656
- [12] DONG Z, ZHONG Q, CHEN PL. The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *J Biol Chem* 1999 Jul 9; **274**(28): 19513–19516.
- [13] DUROCHER D, HENCKEL J, FERSHT AR, JACKSON SP. The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* 1999; **4**(3): 387–394
- [14] FALCK J, PETRINI JHJ, WILLIAMS B R, LUKAS J, BARTEK J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nature Genet* 2002; **30**: 290–294.
- [15] FEATHERSTONE C, JACKSON S. DNA repair: The Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr Biol* 1998; **8**: R622–R625.
- [16] GATEI M, YOUNG D, CEROSALETTI KM, DESAI-MEHTA A, SPRING K, KOZLOV S, LAVIN MF, GATTI RA, CONCANNON P, KHANNA K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 2000; **25**(1): 115–119
- [17] GATTI RA, BERKEL I, BODER E, BRAEDT G, CHARMLEY P, CONCANNON P, ERSOY F, FOROUD T, JASPERS NG, LANGE K ET AL. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988; **8**: 336(6199): 577–580.
- [18] HIEL JA, WEEMAES CM, VAN ENGELEN BG, SMEETS D, LIGTENBERG M, VAN DER BURGT I, VAN DEN HEUVEL LP, CEROSALETTI KM, GABREELS FJ, CONCANNON P. Nijmegen breakage syndrome in a Dutch patient not resulting from a defect in NBS1. *J Med Genet* 2001; **38**(6): E19.
- [19] HOFMANN K., BUCHER P. The FHA domain: a putative nuclear signaling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 347–349.
- [20] HUSTINX TW, SCHERES JM, WEEMAES CM, TER HAAR BG, JANSSEN AH. Karyotype instability with multiple 7/14 and 7/7 rearrangements. *Hum Genet* 1979; **49**(2): 199–208.
- [21] ITO A, TAUCHI H, KOBAYASHI J, MORISHIMA K, NAKAMURA A, HIROKAWA Y, MATSUURA S, ITO K, KOMATSU K. Expression of full-length NBS1 protein restores normal radiation responses in cells from Nijmegen breakage syndrome patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **265**(3): 716–721.
- [22] JASPERS NGJ, GATTI RA, BAAN C, LINSSEN PCM., BOOTSMA D. Genetic complementation analysis of ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: a survey of 50 patients. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **49**: 259–263.
- [23] LEE JH, PAULL TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 2004; **304**(5667): 93–96.
- [24] LIM DS, KIM ST, XU B, MASER RS, LIN J, PETRINI JH, KASTAN MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 2000; **404**(6778): 613–617.
- [25] LOMBARD DB, GUARENTE L. Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res* 2000; **60**(9): 2331–2334.
- [26] LUO G. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7376–7381.
- [27] MARASCHIO P, DANESINO C, ANTOCCIA A, RICORDY R, TANZARELLA C, VARON R, REIS A, BESANA D, GUALA A, TIEPOLO L. A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 2001; **38**(2): 113–117.
- [28] MARASCHIO P., PERETTI D, LAMBIASE S, LOCURTO F, CAUFIN D, GARGANTINI L, MINOLI L, ZUFFARDI O. A new chromosomal instability disorder. *Clin Genet* 1986; **30**: 353–365.

- [29] MARASCHIO P, SPADONI E, TANZARELLA C, ANTOCCIA A, DI MASI A, MAGHNI M, VARON R, DEMUTH I, TIEPOLO L, DANESINO C. Genetic heterogeneity for a Nijmegen breakage-like syndrome. *Clin Genet* 2003; **63**(4): 283–290
- [30] MASER RS, ZINKEL R, PETRINI JH. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 2001; **27**(4): 417–421.
- [31] MATSUURA S, TAUCHI H, NAKAMURA A, KONDO N, SAKAMOTO S, ENDO S, SMEETS D, SOLDER B, BELOHRADSKY BH, DER KALOUSTIAN VM, OSHIMURA M, ISOMURA M, NAKAMURA Y, KOMATSU K. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 1998; **19**(2): 179–181.
- [32] MORALL N, BERTRANPETIT J, ESTIVILL X, NUNES V, CASALS T, GIMENEZ J, REIS A, VARON R, MACEK M, KALAYDJIEVA L et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 1994; **7**: 169–175.
- [33] NAKANISHI K, TANIGUCHI T, RANGANATHAN V, NEW HV, MOREAU LA, STOTSKY M, MATHEW CG, KASTAN MB, WEAVER DT, D'ANDREA AD. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biol* 2002; **4**: 913–920.
- [34] O'DRISCOLL M, CEROSALETTI KM, GIRARD PM, DAI Y, STUMM M, KYSELA B, HIRSCH B, GENNERY A, PALMER SE, SEIDEL J, GATTI RA, VARON R, OETTINGER MA, NEITZEL H, JEGGO PA, CONCANNON P. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell* 2001; **8**(6): 1175–1185.
- [35] PAULL TT, GELLERT M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 1999; **13**(10): 1276–2788.
- [36] RESNICK IB, KONDRATENKO I, TOGOEV O, VASSERMAN N, SHAGINA I, EVGRAFOV O, TVERSKAYA S, CEROSALETTI KM, GATTI RA, CONCANNON P. Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. *J Pediatr* 2002; **140**(3): 355–361.
- [37] SAAR K, CHRZANOWSKA KH, STUMM M, JUNG M, NURNBERG G, WIENKER TF, SEEMANOVA E, WEGNER RD, REIS A, SPERLING K. The gene for ataxia-telangiectasia variant, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 605–610.
- [38] SAVITSKY K, BAR SHIRA A, GILAD S, ROTMAN G, ZIV Y, VANAGAITE L, TAGLE DA, SMITH S, UZIEL T, SFEZ S. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; **268**: 1749–1753.
- [39] SEEMANOVA E, PASSARGE E, BENESKOVA D, HOUSTEK J, KASAL P, SEVICKOVA M. Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk of lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 1985; **20**: 639–648.
- [40] STEWART GS, MASER RS, STANKOVIC T, BRESSAN DA, KAPLAN MI, JASPERS NG, RAAMS A, BYRD PJ, PETRINI JH, TAYLOR AM. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 1999; **99**(6): 577–587.
- [41] STUMM M, GATTI RA, REIS A, UDAR N, CHRZANOWSKA KH, SEEMANOVA E, SPERLING K, WEGNER RD. The ataxia-telangiectasia-variant genes 1 and 2 are distinct from the ataxia-telangiectasia gene on chromosome 11q23.1. (Letter) *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 960–962.
- [42] STUMM M, SPERLING K, WEGNER RD. Noncomplementation of radiation-induced chromosome aberrations in ataxia-telangiectasia/ataxia-telangiectasia-variant heterodikaryons. (Letter) *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 1246–1251.
- [43] TAALMAN RDM, HUSTINX TWJ, WEEMAES CMR, SEEMANOVA E, SCHMIDT A, PASSARGE E, SCHERES JMJC. Further delineation of the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Hum Genet* 1989; **32**: 425–431.
- [44] TAUCHI H, KOBAYASHI J, MORISHIMA K, VAN GENT DC, SHIRAISHI T, VERKAIK NS, VANHEEMS D, ITO E, NAKAMURA A, SONODA E, TAKATA M, TAKEDA S, MATSUURA S, KOMATSU K. Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 2002; **420**(6911): 93–98.
- [45] TRUJILLO KM, YAUN SSF, LEE EYHP, SUNG P. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors RAD 50, MRE11 and p95. *J Biol Chem* 1998; **273**: 21447–21450.
- [46] VAN DER BURGT I, CHRZANOWSKA KH, SMEETS D, WEEMAES C. Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 1996; **33**: 153–156.
- [47] VARON R, VISSINGA C, PLATZER M, CEROSALETTI KM, CHRZANOWSKA KH, SAAR K, BECKMANN G, SEEMANOVA E, COOPER PR, NOWAK NJ, STUMM M, WEEMAES CMR, GATTI RA, WILSON RK, DIGWEED M, ROSENTHAL A, SPERLING K, CONCANNON P, REIS A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998; **93**: 467–476.

- [48] 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.
- [49] WEEMAES CMR, HUSTINX TWJ, SCHERES JMJC, VAN MUSTER PJJ, BAKKEREN JAJM, TAALMAN RDFM. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1981; **70**: 557–564.
- [50] WEGNER RD, METZGER M, HANEFELD F, JASPERS NGJ, BAAN C, MAGDORF K, KUNZE J, SPERLING K. A new chromosomal instability disorder confirmed by complementation studies. *Clin Genet* 1988; **33**: 20–32.
- [51] WU G, LEE WH, CHEN PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 2000; **275**(39): 30618–30622.
- [52] XIAO Y, WEAVER DT. Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 2985–2991.
- [53] YAMAGUCHI-IWAI Y. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *EMBO J* 1999; **18**: 6619–6629.
- [54] YAZDI PT, WANG Y, ZHAO S, PATEL N, LEE EY-HP, QIN J. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes & Dev* 2002; **16**: 571–582.
- [55] ZHAO S, RENTHAL W, LEE EY-HP. Functional analysis of FHA and BRCT domains of NBS1 in chromatin association and DNA damage responses. *Nucleic Acids Research* 2002; **30**, 22: 4815–4822.
- [56] ZHAO S, WENG YC, YUAN SS, LIN YT, HSU HC, LIN SC, GERBINO E, SONG MH, ZDZIENICKA MZ, GATTI RA, SHAY JW, ZIV Y, SHILOH Y, LEE EY. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 2000; **405**(6785): 473–477.
- [57] ZHONG Q, CHEN CF, LI S, CHEN Y, WANG C-C, XIAO J, CHEN P-L, SHARP ZD, LEE W-H. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 1999; **285**: 747–750.
- [58] ZHU XD, KUSTER B, MANN M, PETRINI JH, LANGE T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000; **25**(3): 347–352.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 04.07.2004 r.

Przyjęto: 08.10.2004 r.

*Instytut Genetyki Człowieka, PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
e-mail: m_mosor@man.poznan.pl*

RECEPTORY PROLAKTYNOWE U CZŁOWIEKA I RÓŻNYCH GATUNKÓW ZWIERZĄT

PROLACTIN RECEPTORS IN HUMAN
AND VARIOUS ANIMAL SPECIES

Marcin WYLOT¹, Maria LASZCZYŃSKA¹,
Sylvia SŁUCZANOWSKA-GŁĄBOWSKA²

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii¹, Katedra i Zakład Fizjologii²
Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

Streszczenie: Błonowy receptor prolaktyny wykazuje różnice zarówno międzygatunkowe, jak i wewnątrzsobnicze. Występowanie różnych wariantów receptora (izoforn) w narządach i tkankach u tego samego osobnika umożliwia regulację sygnału przekazywanego przez ten hormon. Artykuł przedstawia przegląd informacji na temat ekspresji różnych izoforn receptora u człowieka i różnych gatunków zwierząt oraz najnowsze dane na temat dalszych procesów wewnątrzkomórkowych, jakie następują po związaniu liganda z receptorem do etapu aktywacji określonych genów.

Słowa kluczowe: receptor prolaktyny, izoforny receptora, transdukcja sygnału, cytokiny.

Summary: Membrane prolactin receptor differs among species and in the individual. Various isoforms of receptor expressed on tissues of that same individual enables regulation of signal transduction generated by prolactin. Following article describes available information presenting expression of various isoforms of prolactin receptor in human and other species and latest updates in intracellular processing, subsequent to ligand's binding initiating activation promoters of definite genes.

Key words: prolactin receptor, isoforms of prolactin receptor, signal transduction, cytokines.

Wykaz skrótów: **PRL** (prolactin) – prolaktyna, **PRLR** (prolactin receptor) – receptor prolaktynowy, **STAT** (signal transducers activators of translation) – białka STAT, **SOCS** (suppressors of cytokine signaling) – białka SOCS, **MAPK** (mitogen activated protein kinase) – kinaza aktywowana mitogenem, **JAK** (just another kinase/janus kinase) – kinaza janusowa, **SH** – src-c – homology, **PI3K** (phosphatidylinositol-3 kinase) – kinaza fosfatydyloinozytolu 3', **Tyr** – tyrozyna, **Thr** – treonina, **Asn** – asparagina, **Cys** – cysteina, **Trp** – tryptofan, **Ser** – seryna, **KIR** (kinase inhibitory region) – region hamujący kinazę, **GAS** (γ interferon activated sequence) – sekwencja aktywowana interferonem γ .

WSTĘP

Białkowy hormon prolaktyna (PRL) ma receptory (PRLR) związane z błoną komórkową, chociaż odkryto również receptor rozpuszczalny, swobodnie krążący w przestrzeni pozakomórkowej. Błonowe PRLR należą do nadrodziny receptorów cytokin hematopoetycznych. Do rodziny tej zaliczają się również receptory dla: hormonu wzrostu (GH), niektórych interleukin (IL od 2 do 15 z wyjątkiem 8), erytropoetyny (EPO), czynnika stymulującego kolonie granulocytów i monocytów (GM-CSF), czynnika stymulującego kolonie granulocytów (G-CSF), czynnika hamującego rozwój białaczki (LIF), onkostatyny M (OM), trombocytopoetyny (TPO), *obesity factor leptin* (OFL) oraz neurotroficznego czynnika rzęskowego (CNTF) [1,27,21]. Są to receptory zakotwiczone w błonie komórkowej. Receptory tej rodziny łączy obecność sekwencji aminokwasów o wysokiej konserwatywności, pomimo innej lokalizacji kodujących je genów w genomie.

Efektem interakcji hormon-receptor jest aktywacja genów specyficznych dla danego gatunku, narządu, płci i okresu rozrodczego [19].

GEN RECEPTORA

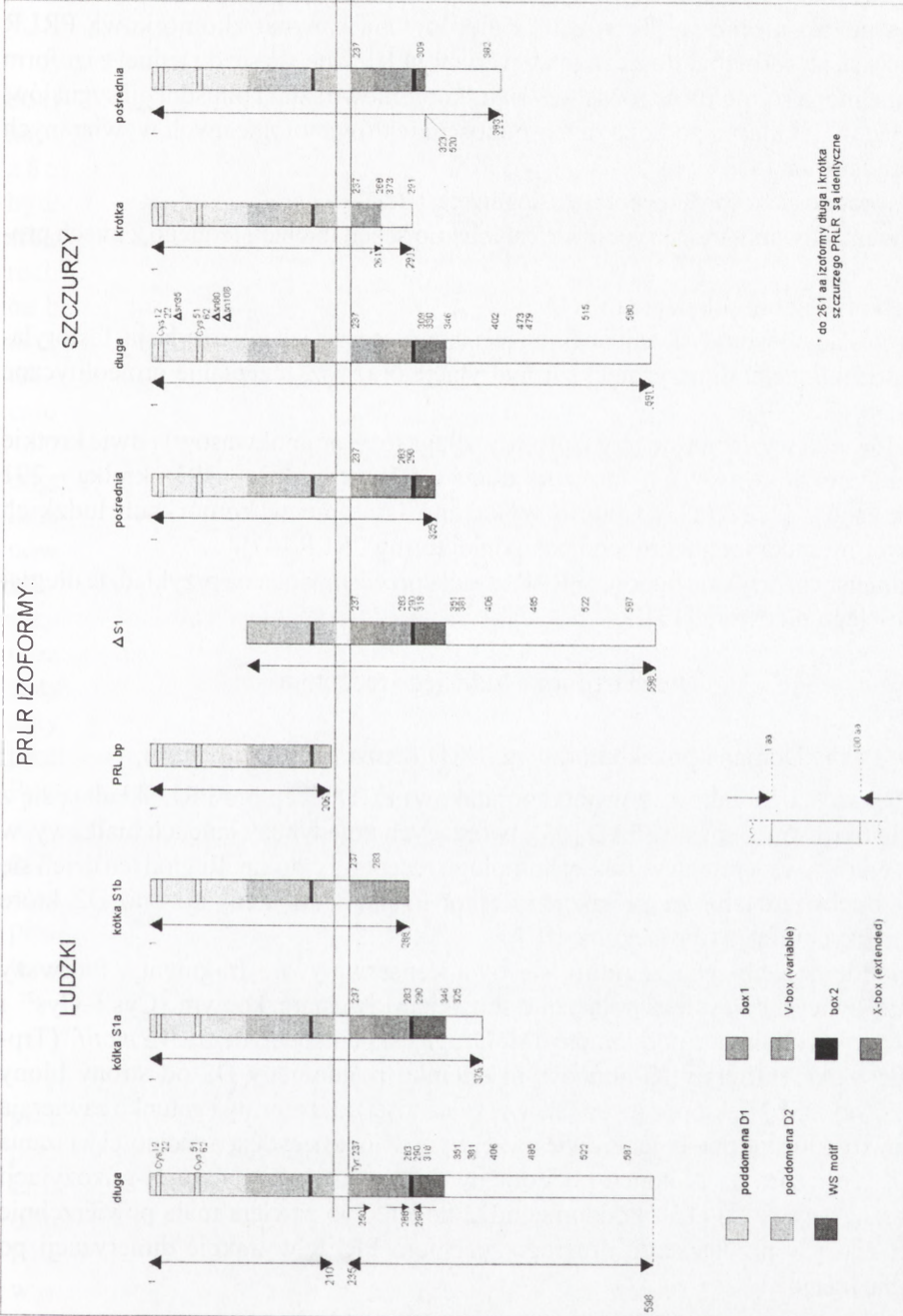
U człowieka pierwszorzędową strukturę PRLR koduje gen zlokalizowany na chromosomie 5(p13→14) złożony z 11 eksonów łącznie przekraczających długość 100 kb tworzących łańcuch 622 aminokwasów zawierający 24-aminokwasowy peptyd sygnałowy [1,7]. Eksony 1–9 są wspólne dla izoformy krótkiej i długiej ludzkiego PRLR, kodują domeny: wewnątrzkomórkową, przezbłonową i część domeny wewnątrzkomórkowej położonej bliżej N-końca PRLR. Powstanie różniących się domeną wewnątrzkomórkową izoform krótkich S1a i S1b osiągane jest dzięki alternatywnemu składaniu transkryptu eksonów odpowiednio 10–11 i 9–11 [74,38]. Izoforny pośrednie zawdzięczają swoje istnienie delecjom [47]. Ponadto opisane zostało istnienie transkryptów mRNA, które kodują potencjalnie nowe izoformy. Jak dotychczas nie wykazano jednak produktów ich translacji [50].

Regulacja genu receptora

Nadzór nad transkrypcją genu receptora prolaktyny spełniają trzy regiony promotora. Pierwszy z nich występuje w gonadach, drugi w wątrobie, a trzeci jest rozpowszechniony we wszystkich tkankach, włącznie z gonadami i wątrobą [39,41,42].

BUDOWA I RODZAJE RECEPTORÓW

Receptory prolaktynowe zostały zidentyfikowane u różnych gatunków kręgowców od ryb do ssaków. Pomimo międzygatunkowych różnic długości łańcucha białkowego i sekwencji aminokwasów PRLR istnieją fragmenty łańcucha białkowego zwane domenami, które cechują się dużym stopniem homologii. Liczne prace doświadczalne wykazały, że domeny te spełniają kluczową rolę w procesach przekazywania sygnału



RYCINA 1. Izoformy receptora prolaktynowego (PRLR) u człowieka i szczurza (zmodyfikowane wg Clevanger [20])

biologicznego: wiązania liganda, dimeryzacji receptora, aktywacji białek transdukcji sygnału i aktywacji określonych genów [55,49,19].

Receptor PRL składa się z trzech odcinków tzw. domen: pozakomórkowej, przezbłonowej i wewnątrzkomórkowej [1,27]. W obrębie gatunku, u tego samego osobnika występują receptory zróżnicowane pod względem długości oraz budowy domeny wewnątrzkomórkowej. Wyjątek stanowi ludzki receptor $\Delta S1$, który różni się domeną pozakomórkową. Te różniące się domeną wewnątrzkomórkową PRLR nazywane są izoformami. Poszczególne warianty PRL, wiążąc się do jednej z izoform receptora, mogą stymulować różne wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnałów, stanowiąc molekularne podłoże różnorodności efektów biologicznych wywieranych przez ten hormon [43].

Różnorodność izoform receptora osiągnana jest dzięki:

- ◆ zapoczątkowaniu transkrypcji w różnych miejscach inicjacji jednego z trzech promotorów;
- ◆ alternatywnemu składaniu mRNA;
- ◆ potranslacyjnej modyfikacji obejmującej takie procesy, jak: glikozylacja, fosforylacja, deaminacja, dimeryzacja, sulfhydrylacja oraz rozszczepianie proteolityczne [74,38,47,30,40,43].

U człowieka wyróżnia się trzy izoformy: długą (598 aminokwasów) i dwie krótkie (376 i 288 aminokwasów); a u szczura długą – 591, pośrednią – 393 i krótką – 291 aminokwasów [1,27,31]. Ostatnio wykazano istnienie w komórkach ludzkich nowotworów sutka i jelita grubego pośredniej formy PRLR [47].

W niniejszym artykule budowa PRLR została przedstawiona na przykładzie długiej izoformy tego receptora [13].

Długa izoforma ludzkiego receptora

1. Domena pozakomórkowa, ECD (*extra cellular domain*)

U większości gatunków (z wyjątkiem ptaków) ECD receptora PRL składają się z 210 aminokwasów o masie 85 kD [43], tworzących pojedynczy łańcuch białkowy, w którym wyróżnia się region wysokiej homologii receptora cytokin. Region ten dzieli się na dwie odpowiedzialne za interakcje receptor-ligand poddomeny D1 oraz D2, które budową przypominają fibronektynę III.

W poddomenach tych znajdują się dwa konserwatywne fragmenty. Pierwszy stanowią dwie pary cystein połączone mostkiem dwusiarczkowym (Cys¹²–Cys²² i Cys⁵¹–Cys⁶²) na N-końcu poddomeny D1. Drugi jest pentapeptydem „*WS motif*” (Trp-Ser-other AA-Trp-Ser) w C-końcowym odcinku poddomeny D2 od strony błony komórkowej [68]. Niektóre z receptorów w zależności od izoformy i gatunku zawierają dodatkowo odmienne domeny, ale dwie wyżej wymienione decydują o zdolności wiązania liganda. U szczura na N-końcu poddomeny D1 zawarte są miejsca N-glikozylacji receptora (Asn^{18, 80, 108}) [15]. Poddomena D2 dodatkowo zawiera małą powierzchnię uczestniczącą w przyłączeniu drugiego receptora PRLR w trakcie dimeryzacji po związaniu liganda.

2. Domena przez błonową, TMD (*trans membrane domain*)

U wszystkich gatunków utworzona jest przez pojedynczy łańcuch 24 aminokwasów (211–234 aminokwasów w ludzkim i szczurzym PRLR) przechodzący jednokrotnie przez błonę komórkową. Jak dotychczas nie wykazano w tej domenie sekwencji aminokwasów kluczowych dla funkcjonowania receptora.

3. Domena wewnątrzkomórkowa, ICD (*intracellular domain*)

Zawiera cztery regiony o wysokiej konserwatywności międzygatunkowej nazwane: box1, V-box (*variable*), box 2 i X-box (*extended*), z których box1 i 2 cechują się najwyższym stopniem konserwatywności. Bliższy błonie komórkowej box1 składa się z 8 aminokwasów (243–250 w szczurzym PRLR) z dominacją proliny i aminokwasów hydrofobowych. Sekwencja aminokwasów zapewnia temu fragmentowi swoiste sfałdowanie struktury III-rzędowej rozpoznawane przez mające domenę SH3 enzymy realizujące dalszą transdukcję sygnału – kinazy JAK2 [36,16,26]. Położony dystalnie od błony komórkowej box2 zawiera serię hydrofobowych, naprzemiennie ujemnie i dodatnio naładowanych aminokwasów (288–298 w szczurzym PRLR). Box1 występuje we wszystkich izoformach receptora PRL, natomiast box2 w długich, pośrednich u człowieka i szczura oraz w izoformie krótkiej S1a u człowieka.

Na całej długości domeny wewnątrzkomórkowej występują reszty tyrozyny (Tyr) odgrywające kluczową rolę dla wywołania odpowiedzi komórkowej. Długa izoforma ludzkiego PRLR różni się od szczurzego PRLR obecnością 10 a nie 9 reszt tyrozynowych. Jednak ich lokalizacja i sąsiadujące aminokwasy sugerują homologiczną funkcję. Ufosforylowane reszty Tyr są miejscem, w którym do receptora mogą wiązać się białka mające domeny SH2, takie jak pośredniczące w transdukcji sygnału białka STAT [62] oraz fosfatazy reszt tyrozynowych białek zawierających domenę SH2 (SHP2) [3]. W dotychczasowych pracach u szczura wykazano, że fosforylacja Tyr⁵⁸⁰ uczestniczy w aktywacji laktogenezy, a fosforylacja Tyr³⁰⁹ i ³⁸² jest kluczowa dla aktywacji genów proliferacji komórek nabłonka gruczołów mlekowych w odpowiedzi na PRL [1,62]. Położona u człowieka najbliżej C-końca receptora Tyr⁵⁸⁷ uczestniczy w formowaniu miejsca przylegania białka STAT [63]. Trzeciorzędową strukturę receptora wyznacza głównie domena pozakomórkowa. Każda z tworzących ją poddomen D1 i D2 składa się z siedmiu przeciwskrętnych nici β tworzących dwie naprzeciwległe struktury β -płaszczyznowe połączone pięcio-aminokwasowym odcinkiem. Płaszczyzny te fałdują się tworząc miejsce wiążące ligand [1].

Pośrednia izoforma ludzkiego receptora

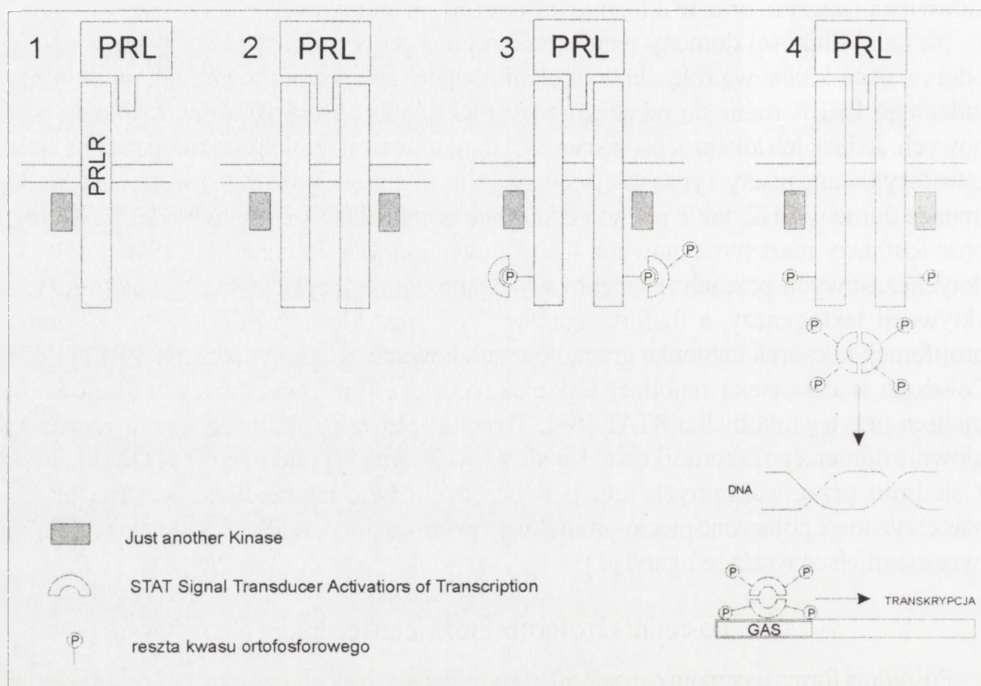
Pośrednia forma receptora o masie 50 kD powstaje jako efekt przesunięcia ramki odczytu podczas składania transkryptu – prowadząc do delekcji 191 aminokwasów części ICD położonych dystalnie od odcinka C domeny X-box i dodania 13-aminokwasowej sekwencji. Delekcja ta w badanych modelach linii komórkowych nie upośledzała aktywacji JAK2, zależnej od położonej proksymalnie domeny box-1, uniemożliwiała jednak aktywację kinazy tyrozynowej Fyn związanej z fosforylacją reszt tyrozynowych receptora. Następstwem delekcji jest słabsza w porównaniu z długą izoformą receptora zdolność do transdukcji sygnału biologicznego [47].

Δ S1 izoforma ludzkiego receptora

Mającą masę 70 kD izoforma Δ S1 jest również produktem alternatywnego składowania transkryptu – delecji eksonu 4 i 5, skutkiem czego izoforma ta pozbawiona jest poddomeny D1 N-końca receptora. Cecha ta wyróżnia tę izoformę spośród innych: pozostałe różnią się między sobą ICD, podczas gdy ta różni się ECD. Brak uczestniczącej w wiązaniu liganda poddomeny D1 osłabia 7-krotnie zdolność wiązania PRL przez izoformę Δ S1 w porównaniu z izoformą długą [46].

Rozpuszczalna izoforma ludzkiego receptora

Receptor rozpuszczalny występujący w płynie pozakomórkowym, w ludzkim osoczu osiąga stężenie 14 ng/ml, gdzie wiąże ok. 36% krążącej PRL. Ma masę 32 kD, składa się tylko z domeny pozakomórkowej 206 aminokwasów i utożsamiany jest z białkiem wiążącym prolaktynę (PRLbp) [6]. Jest on produktem alternatywnego składowania egzonów 7–11 mRNA PRLR [74]. Poprzez analogię z innymi białkami osocza wiążącymi hormony przypuszczać należy, że białko to wydłuża okres półtrwania w osoczu ograniczając degradację oraz hamuje sekrecję i moduluje biologiczne oddziaływanie PRL.



RYCINA 2. Uproszczony schemat procesu dimeryzacji receptora prolaktynowego – transdukcji sygnału szlakiem kinaz JAK i białek STAT. 1) Związanie liganda PRL z jednym receptorem PRLR (monomer). 2) Związanie przez ligand drugiego receptora PRLR (dimer). 3) Aktywacja konstytutywnie związanej kinazy JAK, fosforylacja reszt tyrozynowych receptora, wiązanie białek STAT i ich fosforylacja. 4) Oddysocjowanie ufosforylowanych białek STAT, utworzenie kompleksu, migracja kompleksu białek STAT na teren jądra komórkowego, wiązanie z promotorem określonego genu (tu GAS), indukcja transkrypcji (zmodyfikowane wg Clevanger i wsp. [20])

Krótkie izoformy ludzkiego receptora S1a, S1b

Alternatywne składanie transkryptu mRNA części lub całości eksonów 10 oraz 11 prowadzi do powstania izoform krótkich: S1a o masie 56, oraz S1b o masie 42 kD. Pierwszy z tych receptorów ma domeny box1 i box2, podczas gdy drugi tylko fragmenty domeny box1. Podobnie jak w przypadku zwierząt izoformy te nie wykazują aktywności biologicznej, a poprzez wiązanie liganda do swojej cząsteczki osłabiają działanie PRL [74,38].

TRANSDUKCJA SYGNAŁU

Połączenie receptor - ligand zapoczątkowuje kaskadę reakcji wewnątrzkomórkowych prowadzących docelowo do aktywacji genów – odbiorców sygnału. Mechanizmy uczestniczące w procesie transdukcji sygnału w układzie PRL-PRLR nie zostały w pełni odkryte i wiele szczegółów tego procesu pozostaje niewyjaśnionych.

Dimeryzacja receptora

Proces przyłączenia PRL do receptora przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie cząsteczka hormonu wiąże się za pomocą powierzchni wiążącej do jednego receptora PRL. Powstały monomer jest jednak pozbawiony aktywności biologicznej. W drugim etapie ta sama cząsteczka hormonu za pomocą drugiej powierzchni wiążącej łączy się z drugim receptorem PRL. Dopiero tak utworzony dimer jest obdarzony zdolnością do wywołania biologicznego efektu. Dimeryzacja receptora, do jakiej dochodzi w trakcie wiązania PRL, musi dotyczyć tej samej izoformy receptora [25,16].

W interakcji receptor-ligand, kluczowa rola przypada strukturze pierwszo- i trzeciorzędowej domeny pozakomórkowej, zwłaszcza obecności regionów cechujących się konserwatywnym ewolucyjnym.

Transdukcja

Dotychczas wyodrębniono trzy drogi przekazywania sygnału przez PRL [1,27,21,36]:

- 1) szlak kinaz JAK – białko STAT,
- 2) szlak kinaz RAS, Raf, MAPK,
- 3) inne sugerowane szlaki.

Szlak kinaz JAK – białko STAT

Jak wszystkie receptory nadrodziny cytokin hematopoetycznych PRLR przekazuje sygnał wewnątrzkomórkowo kooperując z kinazami JAK [59,21]. Główną kinazą w odniesieniu do PRL jest JAK2 [14]. Badania nad kinazą JAK1 i JAK3 nie potwierdziły jednoznacznie ich udziału w transdukcji sygnału biologicznego [29].

Oddziaływanie w układzie PRLR-JAK2 zachodzi na poziomie box1 domeny wewnątrzkomórkowej receptora. Domena ta występuje we wszystkich izoformach receptora (długiej, pośredniej i krótkiej) [27]. Obecność proliny w poddomenie box1 warunkuje III-rzędową strukturę przestrzenną zdolną do konstytucyjnego (a więc niezależnego od wiązania liganda) wiązania kinaz JAK mających domeny SH3 [67,51]. Dotychczas nie udało się jednak odnaleźć pasujących do box1 sekwencji aminokwasów kinazy JAK2 [58]. Wiele danych sugeruje współdziałanie reszt aminokwasów C-końcowego odcinka PRLR [25] lub współdziałanie białka adaptorowego. Delecja box1 lub mutacja w obrębie C-końca receptora PRLR pozbawiają go aktywności biologicznej [1,16].

Aktywacja receptora odbywa się przez przyłączenie PRL, co zapoczątkowuje dimeryzację receptora prowadząc do przestrzennego zbliżenia dwóch związanych z domeną wewnątrzkomórkową kinaz JAK2. Taki układ przestrzenny umożliwia im wzajemną fosforylację (autoaktywacja), fosforylację reszt tyrozynowych receptora oraz białek STAT [36,33]. Zjawisko fosforylacji reszt tyrozynowych dotyczy izoformy długiej i pośredniej PRLR, natomiast nie zachodzi w krótkiej mimo obecności czterech Tyr [34]. W tej ostatniej izoformie szczurzego PRLR kluczową rolę odgrywa 30 C-końcowych aminokwasów (aminokwasy od 262 do 291) o sekwencji niespotykanej w pozostałych izoformach [1].

Długa izoforma szczurzego PRLR ma w domenie wewnątrzkomórkowej 9 reszt tyrozynowych. Kluczowa rola przypada Tyr⁵⁸⁰, która ulega fosforylacji pod wpływem PRL. Jest ona niezbędna do aktywacji genu promotora β -kazeiny i białka STAT5. Szczegółowe badania [62] dowiodły, że fosforylacji może również ulegać Tyr⁴⁷³ i ⁴⁷⁹, a w warunkach nadmiaru JAK2 również Tyr³⁰⁹, ⁴⁰², ⁵¹⁵. W pośredniej izoformie receptora szczurzego, która zawiera trzy reszty tyrozynowe fosforylacji ulega tylko C-końcowa Tyr³⁸². Dla aktywacji genów związanych z laktogenezą i innymi funkcjami metabolicznymi fosforylacja jest niezbędna, podczas gdy dla wywołania efektu mitogennego receptor nie wymaga fosforylacji reszt tyrozynowych [16].

Ufosforylowanie reszt tyrozynowych receptora zapewnia domenie wewnątrzkomórkowej konformację (*docking site*) umożliwiającą wiązanie domen SH2 białka STAT [62]. Następnie kinaza JAK fosforyluje białko STAT. Tak zmodyfikowane białko oddysocjowuje od kompleksu receptor-JAK, aby w interakcji pomiędzy resztami ufosforylowanej tyrozyny i domenami SH2 utworzyć dimer złożony z dwóch białek STAT. Powstały dimer białek STAT migruje na teren jądra komórkowego, gdzie aktywuje promotory określonych genów.

Kompleks białek STAT przyłącza się do fragmentu DNA zawierającego sekwencję nukleotydów TTCXXXGAA zwanego GAS [37]. Sekwencja ta występuje w promotorach wielu genów i oprócz białek STAT aktywuje ją *in vivo* wiele innych cytokin [32].

Szlak kinaz Ras/Raf/MAPK

Z dużym prawdopodobieństwem należy sądzić, że ufosforylowane reszty Tyr mogą stać się miejscem przyłączania białek adaptorowych Shc/Grb2/SOS, które sprzęgają PRLR z kinazami Ras/Raf/MAPK [22,57]. Nowsze doniesienia sugerują związek pomiędzy szlakiem JAK/STAT i MAPK.

Szlak kinaz c-src i Fyn

Opisana została aktywacja kinaz c-src pod wpływem działania PRL [71] oraz kinazy Fyn (p59) [5]. Kinazie Fyn przypisywany jest udział w aktywacji kinazy fosfatydyloinozytolu (PI'3K) oraz fosforylacja Tyr substratu receptora insulinowego I (IRS1) [11,76]. Wykazano również udział kinazy Fyn w aktywacji kanałów K^+ i proliferacji linii komórkowej LNCaP [75].

Oddziaływanie na kanały jonowe

Poddomena box1 ICD PRLR uczestniczy w aktywacji kanału K^+ zależnego od kinazy tyrozynowej poprzez JAK2. C-końcowy fragment PRLR uczestniczy w powstawaniu przekazników wewnątrzkomórkowych pochodnych inozytolu otwierających kanały Ca^{2+} bramkowane potencjałem (inozytolo 1,3,4,5 tetrafosforanu – $Ins(1,3,4,5)P_4$, inozytolo sześćfosforanu – $InsP_6$) [65,72].

REGULACJA TRANSDUKCJI

Spośród ośmiu białek STAT w transdukcji sygnału prolaktyny zaangażowane są: STAT 1, 3 oraz 5a i 5b. STAT5a i 5b są najlepiej udokumentowanymi czynnikami odpowiedzialnymi za transdukcję sygnału przez długą i pośrednią izoformę PRLR [56,28]. Każde z białek tej rodziny składa się z pięciu domen: wiążącej DNA, SH3, SH2, N-końcowej i C-końcowej [54,76,17]. Aby móc się związać z receptorem, białko STAT wymaga obecności ufosforylowanych reszt Tyr [70]. Ponieważ w krótkiej izoformie nie dochodzi do fosforylacji Tyr, miejscem przyłączania się STAT1 mogą stać się ufosforylowane reszty Tyr kinaz JAK2. Po związaniu z receptorem fosforylacji podlegają reszty tyrozynowe białka STAT przykładowo Tyr⁶⁹⁴ STAT5, ale również Ser, Thr [60], w procesie tym uczestniczy prawdopodobnie kinaza białkowa C (PCK- α) oraz kinaza kazeiny II [76]. Nowsze doniesienia wskazują, że białko STAT5 może również odgrywać rolę inhibitora transkrypcji [53].

Fosfatazy Tyr

Fosfatazy tyrozynowe SHP1 i SHP2 mające domenę SH2 odgrywają przez rozkład wiązań fosfoestrowych rolę regulatora negatywnego, jakkolwiek jest to rola słabsza niż w innych receptorach cytokinowych [61,23,10,24,64]. Jednocześnie SHP-2 przez defosforylację Tyr¹⁰⁰⁷ kinazy JAK2 hamuje zależną od SOCS1 ubiquitynację-degradację tej kinazy wzmacniając pośrednio efekt wywierany przez PRL [4].

Równocześnie SHP-2 wiąże się z białkiem STAT5a i razem z nim migruje na teren jądra komórkowego, gdzie uczestniczy w aktywacji promotora genu β -kazeiny [18].

Białka indukowane cytokinami zawierające SH2 (CIS) oraz białka supresorowe sygnału cytokin (SOCS)

Do rodziny tej należy osiem białek hamujących transdukcję sygnału szlakiem JAK/STAT, który jednocześnie odgrywa rolę ich induktora. Tak więc białka rodziny SOCS są elementem pętli hamowania zwrotnego [59]. Wszyscy członkowie tej rodziny mają centralną domenę SH2 oraz C-końcową SOCS box, a białka SOCS1 i 3 dodatkowo N-końcową domenę KIR [48]. CIS konkurują kompetencyjnie z białkami STAT o miejsce wiązania na PRLR [35,76], a SOCS1 i SOCS3 wiążąc się poprzez swoją domenę SH2 z Tyr¹⁰⁰⁷ JAK2 inhibują centrum katalityczne tej kinazy [61,8,52,73]. SOCS2 przypisywana jest zdolność do przywracania wrażliwości komórek na działanie PRL poprzez supresję inhibicji wywołanej przez SOCS1.

PODSUMOWANIE

Potencjalna rola receptora prolaktynowego w regulacji procesów przekazywania sygnału laktogenezy oraz różnicowania i proliferacji komórek pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Dane doświadczalne otrzymane z badań *in vitro* przeprowadzonych na komórkach linii hodowlanych poddanych genetycznym modyfikacjom nie pozwalają na przeniesienie wyników na organizmy w warunkach *in vivo*. Oceniając uzyskane wyniki należy także uwzględnić różnice międzygatunkowe – dotychczas opisane w literaturze receptory: myszy, szczura, królika, świni, bydła domowego, daniela i człowieka mają pewne wspólne domeny, ale pozostałe fragmenty wykazują różnice. Wciąż poszukiwane są fragmenty receptora odpowiedzialne za konkretne działanie. Wiele odkryć jest ukryte w dalszym procesie transdukcji sygnału – roszyfrowanie łamigłówek białek i innych związków uczestniczących w tym procesie oraz ich wzajemnych korelacji stanowi klucz do zrozumienia molekularnych zjawisk stanowiących podłoże obserwowanego działania biologicznego PRL. Zagadnienia te wymagają wielu badań z zastosowaniem nowych technik badawczych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AHONEN TJ, HÄRKÖNEN PL, RUI H, NEVALAINEN MT. PRL signal transduction in the epithelial compartment of rat prostate maintained as long-term organ cultures *in vitro*. *Endocrinology* 2002; **143**: 228–238.
- [2] ALI S, ALI S. Prolactin receptor regulates Stat5 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation by two separate pathways. *J Biol Chem* 2002; **273**: 7709–7716.
- [3] ALI S, ALI S. Recruitment of the protein tyrosine phosphatases shp2 to the c-terminal tyrosine of prolactin receptor and to the adapter protein Gab2. *J Biol Chem* 2000; **275**: 39073–39080.
- [4] ALI S, NOUHI Z, CHUGHTAIN, ALI S. SHP-2 regulates SOCS-1 mediated Janus Kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 2003; **278**: 52021–52031.

- [5] AL-SAKKAF KA, DOBSON PR, BROWN BL. Prolactin induced tyrosine phosphorylation of p59^{lck} may mediate phosphatidylinositol 3-kinase activation in Nb2 cells. *J Mol Endocrinol* 1997; **19**: 347–350.
- [6] AMIT T, DIBNER C, BARKEY RJ. Characterizations of prolactin – and growth hormone binding proteins in milk and their diversity among species. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **130**: 167–180.
- [7] ARDEN KC, BOUTIN J-M, DIJANE J, KELLY PA, CAVENEE WK. The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet* 1990; **53**: 161–165.
- [8] BARKAI U, PRIGENT-TESSIER A, TESSIER CH, GIBORI GB, GIBORI G. Involvement of SOCS-1 the Suppressor of Cytokine Signaling in the prevention of prolactin responsive gene expression in decidual cells. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 554–563.
- [9] BEADLING C, BABBADE JW, CANTREL DA. Interleukin-2 activation of STAT5 requires the convergent action of tyrosine kinases and a serine/threonine kinase distinct from the Raf1/ERK2 MAP kinase pathway. *EMBO J* 1996; **15**: 1902–1913.
- [10] BERCHTOLD S, VOLAREVIC S, MORRIGI R, MERCEP M, GRONER B. Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine Phosphatase inhibit prolactin activation of JAK2 (Janus Kinase 2) and induction of STAT5 (signal transducers and activator of transcription 5) dependent transcription. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 556–567.
- [11] BERLANGA JJ, GUALILLO H, APPLANAT M, KELLY PA, EDERY M. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2050–2052.
- [12] BOLE-FEYSOT C, GOFFIN V, EDERY M, BINART N, KELLY PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; **19**: 225–268.
- [13] BOUTIN JM, EDERY M, SHIROTA M, JOLICOEUR C, LESUER L, ALI S, GOULD D, DIJANE J, KELLY PA. Identification of cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1989; **8**: 1455–1461.
- [14] BROCKMAN JL, SCHROEDER MD, SCHULER LA. PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat path. *Mol Endocrinol* 2002; **16**: 774–784.
- [15] BUTEAU H, PEZET A, FERRAG F, PERROT-APPLANT M, KELLY PA, EDERY M. N-glycosylation of the prolactin receptor is not required for activation of gene transcription but is crucial for its cell surface targeting. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 544–555.
- [16] CHANG W-P, YE Y, CHLEVENGER CHV. Stechiometric structure-function analysis of the prolactin receptor signaling domain by receptor chimeras. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 896–905.
- [17] CHIDAD, WAKAO H, YOSHIMURA A, MIYAJIMA A. Transcriptional regulation of the β -casein gene by cytokines: cross-talk between STAT5 and other signaling molecules. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 1792–1806.
- [18] CHUGHTAI N, SCHIMCHOWITSCH S, LEBRAUN J-J, ALI S. Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the β -casein gene promoter in mammary cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31107–31114.
- [19] CIERESZKO R. Mechanizm działania prolaktyny w układzie rozrodczym samicy. *Post Biol Kom* 2001; **18**: 57–67.
- [20] CLEVANGER CHV, FURTH PA, HANKINSON SE, SCHULER LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev* 2003; **10**: 1–27.
- [21] CLEVANGER C.V, KLINE J.B. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus* 2001; **10**: 706–718.
- [22] DAS R, VONDERHAAR BK. Activation of raf-1, MEK, MAP kinase in prolactin responsive mammary cells. *Breast Cancer Res Treat* 1996; **40**: 141–149.
- [23] DIF F, SAUNIER E, DEMENEIX B, KELLY PA, EDERY M. Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein suppresses PRL signaling by binding the PRL receptor. *Endocrinology* 2001; **142**: 5286–5293.
- [24] EDWARDS GM, WILFORD H, LIU X, HENNINGHAUSEN L, DIJANE J, STREULI CH. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9495–9500.
- [25] FERRAG F, PEZET A, CHIARENZA A, BUTEAU H, NELSON BH, GOFFIN V, KELLY PA. Homodimerisation of IL-2 receptor beta chain is necessary and sufficient to activate Jak2 and downstream signaling pathways. *FEBS Lett* 1998; **421**: 32–36.

- [26] FRASOR J, BARKAI U, ZHONG L, FAZLEBAS AT, GIBORI G. PRL-induced ER α gene expression is mediated by Janus Kinase 2 (Jak2), while Signal Transducer and Activator of Transcription 5b (Stat5b) phosphorylation involves Jak2 and a second kinase. *Mol Endocrinol* 2001; **15**: 1941–1952.
- [27] FREEMAN ME, KANYICSKA B, LERANT A, NAGY G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1523–1631.
- [28] GALLEGO MI, BINART N, ROBINSON GW, OKAGI R, COSHIGANO KT, PERRY J, KOPCHICK JJ, OKA T, KELLY PA, HENNINGHAUSEN L. Prolactin, Growth Hormone, and Epidermal Growth Factor activate Sts5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev Biol* 2001; **229**: 163–175.
- [29] GAO J, HUGHES JP, AUPERIN B, BUTEAU H, EDERY M, ZHAUNG H, WOJCIECHOWSKI DM, HORSEMAN ND. Interactions among Janus kinases and the prolactin (PRL) receptor in the regulation of a PRL response element. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 847–856.
- [30] GLASGAARD ED, NIELSEN JB, MRLDRUP A. Regulation of prolactin receptor (PRLR) gene expression in insulin producing cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 18686–18692
- [31] GOFFIN V, KELLY PA. Prolactin and growth hormone receptors. *Clin Endocrinol* 1996; **45**: 247–255.
- [32] GOUILLEUX F, PALLARD C, DUSANTER-FOURT I, WAKAO H, HALDOSEN LA, NORSTED G, LEVY D, GRONER B. Prolactin, growth hormone, erythropoietin and macrophag-granulocyte colony stimulating factor induce MGF-STAT5 DNA binding activity. *EMBO J* 1995; **14**: 2005–2013.
- [33] GOUILLEUX F, WAKAO H, MUNDT M, GRONER B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr⁶⁹⁴ of STAT5 (MGF) a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J* 1994; **13**: 4361–4369.
- [34] GOUPILLE O, DANIEL N, BIGNON C, JOLIVET G, DIJANE J. Prolactin signal transduction to milk protein genes: carboxyl-terminal part of the prolactin receptor and its tyrosine phosphorylation are not obligatory for JAK2 and STAT5 activation. *Molecular Cell Endocrinology* 1997; **127**: 155–169.
- [35] HELMAN D, SADOWSKI Y, COHEN Y, MATSUMOTO A, YOSHIMURA, MERCHAV S, GERTLER A. Cytokine Inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 Binding Protein (JAB) abolish prolactin receptor mediated STS5 signaling. *FEBS Lett* 1998; **441**: 287–291.
- [36] HIBI M, HIRANO T. Signal transduction through cytokine receptors. *Int Rev Immunol* 1998; **17**: 75–102.
- [37] HORSEMAN ND, YU-LEE LY. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin and cytokines. *Endocrinol Rev* 1994; **15**: 627–649.
- [38] HU ZZ, MENG J, DAFU L. Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of newly identified exon 11. *J Biol Chem* 2001; **276**: 41086–41094.
- [39] HU ZZ, MENG J, DAFU L. Multiple and tissue-specific promoter of gonadal and non gonadal prolactin receptor gene expression. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10242–10246.
- [40] HU ZZ, ZHUANG L, MENG J, TSAI-MORIRS CH, DUFU ML. Complex 5' genomic structure of the human prolactin receptor: multiple alternative exons 1 and promoter utilization. *Endocrinology* 2002; **143**: 2139–2142.
- [41] HU ZZ, ZHUANG L, MENG J, DUFU ML. Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBP β and Sp1. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26225–26235.
- [42] HU ZZ, ZHUANG L, MENG J, LEONDIRES M, DUFU ML. The human prolactin receptor gene structure and alternative promoter utilization: the generic promoter hPIII and novel human promoter hP_N. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 1153–1156.
- [43] JABBOUR HN, KELLY PA. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Rev Reprod* 1997; **2**: 14–18.
- [44] KELLY PA, BINART N, FREEMARK M, LUCAS B, GOFFIN V, BOUCHARD B. Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. *Biochem Soc Tran* 2001; **29**: 48–52.
- [45] KLINE JB, CLEVENGER CV. Identification and characterization of the prolactin binding protein (PRLBP) in human serum and milk. *J Biol Chem* 2001; **276**: 24760–24766.
- [46] KLINE JB, RYCYZYN MA, CLEVENGER CV. Characterization of a novel and functional human prolactin receptor isoform (DS1PRLR) containing only one fibronectin-like domain. *Mol Endocrinol* 2002; **16**: 2310–2322.
- [47] KLINE JB, ROEHRS H, CLEVANGER CHV. Functional characterisation of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 1999; **50**: 35461–35468.
- [48] LARSEN L, RÖPKE C. Suppressors of cytokine signaling: SOCS. *APMIS* 2002; **110**: 833–844.

- [49] LASZCZYŃSKA M. Rola prolaktyny w układzie płciowym męskim. *Post Biol Kom* 2002; **29**: supl.20: 45–59.
- [50] LAUD K, GORDOU I, BELAIR L, PEYRAT J-PH, DIJANE J. Characterization and modulation of prolactin receptor mRNA isoform in normal and tumoral human breast tissues. *Int J Cancer* 2000; **85**: 771–776.
- [51] LEBRUN J-J, ALI S, ULRICH A, KELLY PA. Prolactin induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the receptor and associated tyrosine kinase JAK2. *J Biol Chem* 1994; **269**: 14021–14026.
- [52] LINDEMAN GJ, WITTLIN S, LADA H, NAYLOR M.J, SANTAMARIA M, ZHANG J-G, STARR R, HILTON D.J, ALEXANDER WS, ORMANDY CHJ, VISVADER J. SOCS1 deficiency results in accelerated mammary gland development and rescues lactation in prolactin receptor deficient mice. *Genes Dev* 2001; **15**: 1631–1636.
- [53] LUO G, YU-LEE L-Y. Transcriptional inhibition by STAT5. *J Biol Chem* 1997; **272**: 26841–26849.
- [54] MAYR S, WELTE T, WINDEGGER M, LECHNER J, MAY P, HEINRICH PC, HORN F, DOPPLER W. Selective coupling of STAT factors of the mouse prolactin receptor. *Eur J Biochem* 1998; **258**: 784–793.
- [55] MICHALIK J, BARTOSZEWICZ Z. Prolaktyna (PRL) – wielofunkcyjny, przysadkowy hormon peptydowy. *Post Bioch* 2002; **48**: 296–305.
- [56] MIYOSHI K, SHILLINGFORD JM, SMITH GH, GRIMM SL, WAGNER K-U, OKA T, ROSEN JM, ROBINSON GW, HENNINGHAUSEN L. Signal transducers and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* 2001; **155**: 531–542.
- [57] NEMETH E, BOLE-FEYSOT C, TASHIMA LS. Suppression subtractive hybridization (SSH) identifies prolactin induced stimulation of p38 MAP kinase gene expression in Nb2 T lymphoma cells: molecular cloning of rat p38 MAP kinase. *J Mol Endocrinol* 1998; **20**: 151–156.
- [58] O'NEAL K, CHARI MV, McDONALD CH, COOK R, YU-LEE L, MORRISETT JD, SHEARER WT. Multiple *cis-trans* conformers of the prolactin receptor proline-rich motif (PRM) peptide detected by reverse-phase HPLC, CD and NMR spectroscopy. *Biochem J* 1996; **315**: 833–844.
- [59] O'SHEA JJ, GADINA M, SCHREIBER RD. Cytokine signaling in 2002: a new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002; **109 Supp**: 121–131.
- [60] OLAYIOYE MA, GUTHRIDGE M, STOMSKI F.C, LOPEZ AF, VISVANDER JE, LINDEMAN GJ. Threonine 391 phosphorylation of the human prolactin receptor mediates a novel interaction with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 32929–32935.
- [61] PEZET A, FAVRE H, KELLY PA, EDERY M. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 24497–24502.
- [62] PEZET A, FERRAG F, KELLY PA, EDERY M. Tyrosine docking sites of the rat prolactin receptor required for association and activation of Stat5. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25043–25050.
- [64] RAM PS, WAXMAN DJ. Interactions of growth hormone activated STATs with SH-2 containing phosphotyrosine SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17694–17702.
- [65] RATOVONDRAHONA D, FAHIM M, FOURNIER B, ODESSA MF, SKRYMA R, PREVARSKAYA N, DILANE M, DUFY B. Prolactin induces an inward current through voltage-independent Ca²⁺ channels in CHO cells stably expressing the PRL receptor. *J Mol Endocrinol* 1998; **21**: 85–95.
- [66] RATOVONDRAHONA D, FOURNIER B, ODESSA MF, DUFY B. Prolactin stimulation of phosphoinositide metabolism in CHO cells stably expressing the PRL receptor. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; **243**: 127–130.
- [67] REN R, MAYER BJ, CICCETTI P, BALTIMORE D. Identification of ten-amino acid proline rich SH3 binding site. *Science* 1993; **259**: 1157–1161.
- [68] ROZAKIS-ADCOCK M, KELLY PA. Identification of ligand binding determinants of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 7428–7433.
- [69] RYCYZYN MA, REILLY SC, O'MALLEY K, CLEVINGER CHV. Role of Cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 1175–1186.
- [70] SAMIR A, SUHAD A. Prolactin receptor regulates STAT5 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation by two separate pathways. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7709–7716.
- [71] SORENSEN P, SHEFFIELD LG. Involvement of c-src in β -casein gene expression by mammary epithelial cells. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; **247**: 710–713.
- [72] SORIN B, GOUPILLE O, VACHERT AM, PALY J, DIJANE J, VACHERT P. Distinct cytoplasmic regions of the prolactin receptor are required for prolactin-induced calcium entry. *J Biol Chem* 2002; **273**: 28461–28469.

- [73] TAM S.P, LAU P, DIJANE J, HILTON DJ, WATERS MJ. Tissue-specific induction of SOCS gene expression by PRL. *Endocrinology* 2001; **142**: 5015–5026.
- [74] TROTT JF, HOVEY RC, KODURI S, VONDERHAAR BK. Alternative splicing to exon 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein. *J Mol Endocrinol* 2003; **30**: 31-47.
- [75] VAN COPPENOLLE F, SKRYMA R. at all. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Bioch J Immediate Publication* 2003; manuscript BJ20030859.
- [76] VERDIER F, RABIONET R, GOUILLEUX F, BEISENHERZ-HUSS CH, VARLET P, MULLER O, MAYEUX P, LACOMBE SG, CHRETIEN S. A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with associated STAT5a dimmers: a distinct biochemical difference between STST5a and STST5b. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5852–5860.
- [77] VINCENT V, GOFFIN V, ROZKIS-ADCOK M, MORNON JP, KELLY AP. Identification of cytoplasmic motifs required for short prolactin receptor internalisation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7062–7068.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.09.2004 r.

Przyjęto: 08.10.2004 r.

Adres autora: ul. Powst. Wielkop. 72 ,70-111 Szczecin

e-mail: marlot@sci.pam.pl

KOMUNIKATY

W imieniu Komitetu Organizacyjnego

XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej

pragniemy powiadomić Państwa, że XII Zjazd PTIDiK odbędzie się w **Lublinie w dniach 19–22.05.2005 roku.**

Szybki i bezpośredni kontakt z Komitetem Organizacyjnym umożliwia skorzystanie ze strony internetowej:

WWW.immuno.prot.pl.

lub

e-mail: ppożarowski@o2.pl

Aby uzyskać bliższe informacje, prosimy ponadto o kontakt z **Piotrem Pożarowskim** – sekretarzem Zjazdu – tel. (+81) 742 50 26 fax. (+81) 746 70 10
ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego

prof. dr hab. Jacek Roliński

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, JPG), albo pliki z Corela, wersja 9,0 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. Na zdjęciach konieczne jest umieszczanie podziałki wskazującej powiększenie obiektów, a nie podawanie powiększeń w podpisach, gdyż zdjęcia ulegają zmniejszeniu do formatu B₅.

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

Cennik dla Autorów w 2004 r.

	odbitek prac			barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2005 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 20124010531111000004409533.

Cena prenumeraty rocznika	na rok 2005
dla instytucji (bibliotek) wynosi	150 zł
dla odbiorców indywidualnych	50 zł

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2005

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 20124010531111000004409533.

Price per year 25 dollars USA or 21 euro.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi); 2) doniesienia z ostatniej chwili na 3-5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji); 3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępnem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 763) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejny tytuł pracy w języku polskim i angielskim i imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna być w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Na zdjęciach prosimy zamieszczać podziałkę, a nie podawać powiększenia w podpisie w związku z potrzebą zmniejszenia ilustracji. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niczymionionej 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 odtbitnie odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.**

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana, nie została wysłana do innej redakcji	tak nie	tak nie
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak nie	tak nie

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

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

TREŚĆ – CONTENT

W tym Zeszycie	629
RYBACZEK D., MASZEWSKI J.: Komórkowe systemy regulacyjne. Mechanizmy sprzężeń zwrotnych i zależność substrat-produkt w cyklu komórkowym Cellular regulatory systems. Mechanisms of feedback loops and substrate-product dependency in the cell cycle	631
KŁOSIŃSKA M., BŁASIAK J.: Trójniciowy DNA i jego zastosowania Triple-stranded DNA and its applications	647
JEZIERSKA A., MOTYL T.: ALCAM/CD166 (<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>) – adhezyjna cząsteczka regulująca wzrost, rozwój, agregację oraz migrację komórek zdrowych i nowotworowych ALCAM/CD166 (<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>) – adhesion molecule affecting growth, development, aggregation and migration of normal and neoplastic cells	663
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z.: Pączek ogonowy w rozwoju zarodków kręgowców Tail bud in development of vertebrate embryos	681
JAKONIUK D.: Rola transportu błonowego w zjawisku oporności wielolekowej The role of cellular membrane transport in the multidrug resistance	703
PIECHALAK A., TOMASZEWSKA B.: Rola związków tiolowych w roślinach w stresie wywołanym metalami ciężkimi The function of thiol compounds in plants in heavy metal stress	717
MOSOR M., JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA D.: Podłoże molekularne Zespołu Nijmegen Molecular genetics of Nijmegen Breakage Syndrome	735
WYLOT M., LASZCZYŃSKA M., SŁUCZANOWSKA-GŁĄBOWSKA S.: Receptory prolaktynowe u człowieka i różnych gatunków zwierząt Prolactin receptors in human and various animal species	749
Komunikaty	763
Wskazówki dla Autorów i warunki prenumeraty	764