

92435
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 33, ISSUE 1/2006

(1-180)

28.01.06
**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, hybrydocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHOŁA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. (022) 5693830, fax 5693712, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

Indexed in: 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. 14,5. Ark. druk. 11,5. Podpisano do druku w marcu i druk ukończono w maju 2006 r.



„Dispholidus typus”

Proliferacja komórek

Aktywność metaboliczna
Cell Proliferation
Reagent WST-1

Aktywność proliferacyjna
Cell Proliferation
ELISA, BrdU

Cytotoksyczność
Cytotoxicity
Detection Kit (LDH)

Apoptoza

Apoptoza vs. Nekroza
Cell Death Detection
ELISA PLUS

Aktywność kaspazy
Homogeneous
Caspases Assay,
fluorimetric

Sprawdź inne produkty do badań apoptozy
i proliferacji komórek

www.roche-applied-science.com/apoptosis-rocin.org.pl

Roche Applied Science
Zestawy do badań
apoptozy i proliferacji
komórek

Delikatne zadania...
...wymagają
precyzyjnych rozwiązań

Sprawdź w Roche Applied Science świetne rozwiązania do badań apoptozy i proliferacji. Wiele lat doświadczeń stanowi podstawę dla szerokiego zakresu szybkich, niezawodnych zestawów. Nasze najlepsze produkty gwarantują dokładne wyniki, nawet w dużych laboratoriach .



Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdyni 6 B
01-531 Warszawa
Tel. (22) 481 55 67 Faks (22) 481 55 99

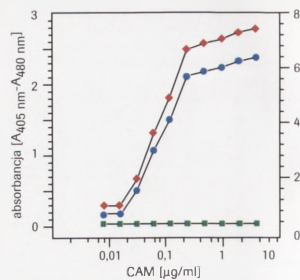
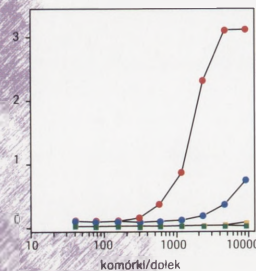
Zestaw - Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Nr kat. 1 774 425 – 96 testów

Nr kat. 1 920 685 – 10 x 96 testów

- Typ oznaczenia:** Jednostopniowa „kanapka“ ELISA, kolorymetryczny
- Zastosowanie:** Ilościowy pomiar apoptozy bez znakowania komórek, odróżnianie apoptozy od nekrozy
- Próbki:** Lizaty komórkowe, supernatanty z hodowli komórkowych, surowica lub osocze
- Specyficzność:** Specyficzne dla nukleosomów zawierających jedno i dwuniciowe DNA, gatunkowo niespecyficzne
- Metoda oznaczenia:** Liza komórek, następnie immunochemiczne oznaczenie fragmentów DNA związanych z histonami w płytce (oznaczanie nekrozy poprzez wykrywanie fragmentów DNA związanych z histonami bezpośrednio w supernatancie z hodowli, bez lizy komórek)
- Czas pomiaru:** 3 godziny
- Czułość:** < 600 komórek

Rysunek 1: Czułość zestawu Cell Death Detection ELISA^{PLUS} na komórkach U937.
Lizat z CAM (czerwony).
Lizat bez CAM (niebieski).
Supernatant z CAM (żółty).
Supernatant bez CAM (zielony).



Rysunek 2: Eksperyment analizowany z użyciem Cell Death Detection ELISA^{PLUS} na komórkach U937.

Lizat (czerwony). Supernatant (zielony). Czynniki wzmacniające lizat (niebieski).

określanie poziomu apoptozy względem nekrozy

- wysoka czułość
- łatwość stosowania

Zestaw - *In Situ* Cell Death Detection Kits

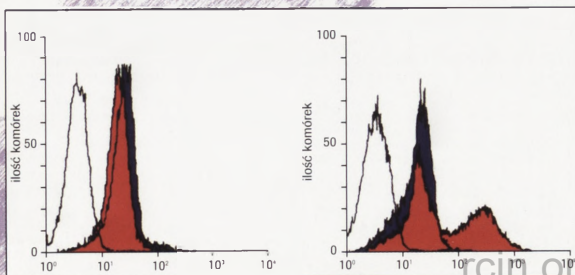
Nr kat. 1 684 809 – 50 testów (AP)

Nr kat. 1 684 795 – 50 testów (Fluoresceina)

Nr kat. 1 684 817 – 50 testów (POD)

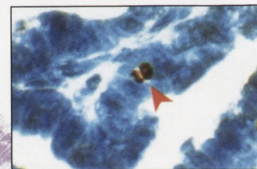
Nr kat. 2 156 792 – 50 testów (TMR red)

- Typ oznaczenia:** Bezpośrednie oznaczenie metodą TUNEL
- Zastosowanie:** Wykrywanie pęknięć nici DNA w komórkach apoptotycznych z zastosowaniem cytometru przepływowego lub mikroskopu fluorescencyjnego
- Próbki:** Komórki w zawiesinie, komórki przylegające do podłoża, rozmazy komórkowe, mrożeniowe lub parafinowe skrawki tkanek
- Specyficzność:** Ilość pęknięć nici DNA w komórkach apoptotycznych jest tak duża, że stopień wyznakowania komórek pozwala na odróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych
- Metoda oznaczenia:** Znakowanie końców DNA przy użyciu dUDP związanego fluorescencyjnie następnie bezpośrednią analizę komórek wyznakowanych fluorescencyjnie
- Czas pomiaru:** 1 - 3 godzin

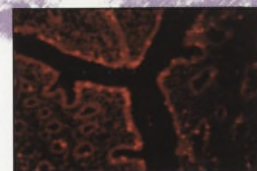


Rysunek 3: Wykrywanie apoptotycznych komórek HL60 z użyciem cytometru przepływowego z zestawem *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein. Mieszanina reakcji TUNEL (niebieski) lub roztwór barwiący (biały) lub PBS dla autofluorescencji (pomarańczowy).

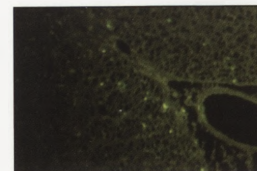
Rysunek 4: Wykrywanie komórek apoptotycznych (zielony) w mikroskopie fluorescencyjnym w fragmencie tkanki z rdzenia kręgowego szczura.



Rysunek 6: Wykrywanie komórek apoptotycznych z użyciem zestawu *In Situ* Cell Death Detection Kit i znakowane peroksydazą w śródbłonku królika.



Rysunek 5: Śródbłonek królika, barwiony z użyciem *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red



W tym Zeszycie

W roku 1982 Robin Warren i Barry Marshall po raz pierwszy wyizolowali spiralną, Gram-ujemną bakterię z błony śluzowej chorych na przewlekłe zapalenie żołądka. Bakteria później została nazwana *Helicobacter pylori*. Okazało się, że jest jednym z patogenów bakteryjnych najczęściej występujących u człowieka. Autorzy za to odkrycie otrzymali w 2005 roku Nagrodę Nobla. Więcej na ten temat Czytelnik znajdzie na stronie 3.

Wyodrębnione przez błony biologiczne przedziały o swoistych właściwościach i funkcjach stanowią cechę charakterystyczną komórki eukariotycznej. Komunikacja między różnymi elementami układu błon wewnętrznych jest jednym z kluczowych warunków prawidłowego funkcjonowania komórki. Brefeldyna A zakłóca tę komunikację i stała się znakomitym narzędziem badawczym umożliwiając poznanie wielu szczegółów organizacji i działania układu błon w komórce. Więcej na ten temat jest na stronie 19.

MikroRNA (miRNA) to grupa jednoniciowych, niekodujących RNA, które regulują ekspresję genów strukturalnych na poziomie posttranskrypcyjnym. Aktywną formę dojrzałą stanowią krótkie fragmenty zbudowane z 21–23 nukleotydów. Wiążą się one z mRNA genu docelowego, co prowadzi do jego degradacji. Więcej na temat takich regulacji ekspresji genów znajdzie Czytelnik na stronie 45.

Badania prowadzone w ostatnich latach dowodzą, że komórki regulatorowe (Treg) pełnią rolę w utrzymaniu tolerancji immunologicznej na własne antygeny organizmu. Komórki regulatorowe stanowią heterogenną subpopulację limfocytów T. Wyróżnia się wśród nich naturalne komórki regulatorowe (nTreg) CD4+CD25+ dojrzewające w grasicy oraz indukowane Treg (Tr1, Th3, CD4+CD25-) nabywające zdolności supresorowych na obwodzie. Ten temat jest omawiany w artykule na stronie 71.

WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 32 Z ROKU 2005
REFEREES OF THE VOLUME 32, 2005

Prof. dr hab. Jolanta Barańska
Prof. dr hab. Jacek Bartkowiak
Prof. dr hab. Andrzej Buczyński
Prof. dr hab. Maria Charzyńska
Dr hab. Andrzej Ciechanowicz
Prof. dr hab. Franciszek Dubert
Dr hab. Józef Dulak
Prof. dr hab. Danuta Duś
Prof. dr hab. Ewa Gregoraszczyk
Prof. dr hab. Barbara Grzelakowska -Sztabert
Prof. dr hab. Lilla Hryniewiecka
Dr hab. Artur Jarmołowski
Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek
Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek
Prof. dr hab. Jerzy Kawiak
Prof. dr hab. Andrzej Kononowicz
Prof. dr hab. Jan Konopacki
Prof. dr hab. Monika Kozłowska
Dr Andrzej Kubalski
Prof. dr hab. Janusz Kubrakiewicz
Prof. dr hab. Leszek Kuźnicki

Prof. dr hab. Marian Lewandowski
Prof. dr hab. Janusz Limon
Prof. dr hab. Ludwik Malendowicz
Prof. dr hab. Tomasz Motyl
Dr hab. Regina Osiecka, prof. nadzw. UŁ
Prof. dr hab. Maria Olszewska
Prof. dr hab. Barbara Płytycz
Prof. dr hab. Zygmunt Pojda
Prof. dr hab. Jadwiga Przała
Prof. dr hab. Antoni Różalski
Prof. dr hab. Lidia Różewicka
Dr hab. Tomasz Sakowicz
Prof. dr hab. Ewa Sikora
Prof. dr hab. Jolanta Skangiel-Kramska
Prof. dr hab. Zofia Szczotka
Prof. dr hab. Adam Szewczyk
Dr hab. Andrzej Szuba
Prof. dr hab. Henryk Urbanek
Dr hab. Katarzyna Wieczorowska-Tobis
Prof. dr hab. Maciej Zabel
Prof. dr hab. Jan Żeromski

ODDZIAŁYWANIA MOLEKULARNE WYBRANYCH CZYNNIKÓW WIRULENCJI *HELICOBACTER PYLORI**

THE MOLECULAR INTERACTIONS OF *HELICOBACTER PYLORI* VIRULENCE FACTORS

Ewa Elżbieta HENNIG

Klinika Gastroenterologii i Hepatologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Centrum Onkologii w Warszawie

Streszczenie: *Helicobacter pylori* jest jednym z najczęściej występujących u ludzi patogenów bakteryjnych. Zasiedlenie śluzówki żołądka przez *H. pylori* jest podstawowym czynnikiem etiologicznym rozwoju choroby wrzodowej dwunastnicy i żołądka oraz raka żołądka. Szereg białek bakteryjnych, w tym szczególnie antygen CagA, cytotoksynę VacA i adhezynę BabA, wiąże się ze zwiększoną wirulencją szczepów *H. pylori*. Różnice w aktywności cytotoksyny VacA i antygeny CagA wynikają z polimorfizmów kodujących je genów. W patogenezie zakażenia kluczową rolę mogą jednak odgrywać specyficzne oddziaływania *H. pylori* z komórką nabłonkową żołądka na poziomie molekularnym.

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*; patogen; wirulencja; choroba wrzodowa; rak żołądka; cytotoksyna wakuolizująca; adhezyny; antygen CagA; interakcje białkowe.

Summary: *Helicobacter pylori* is one of the most frequently observed pathogenic bacterium that colonizes the human stomach. Colonization of gastric mucosa is the main etiologic factor of the development of duodenal and gastric ulcer diseases and gastric adenocarcinoma. The spectrum of bacterial proteins, especially CagA antigen, cytotoxin VacA and BabA adhesin, are correlated with higher virulence of *H. pylori* strains. Differences in activities of cytotoxin VacA and CagA antigen are connected with polymorphisms observed in the genes which coded these proteins. However, the main role in pathogenesis of *H. pylori* infection might play specific interactions between *H. pylori* and gastric epithelial cell on the molecular level.

Key words: *Helicobacter pylori*; pathogen; virulence; ulcer disease; gastric cancer; vacuolization cytotoxin; adhesions; CagA antigen; protein interactions.

*Praca została opublikowana w związku z Nagrodą Nobla przyznaną w 2005 roku R. Warrenowi i B. Marshallowi. Praca była finansowana w ramach grantu KBN (6 PO4A 031 15) oraz projektów CMKP (501-2-2-08-13/01, 501-1-1-09-20/03 i 501-1-1-09-17/04).

WPROWADZENIE

W 1982 roku Robin Warren i Barry Marshall po raz pierwszy wyizolowali spiralną, Gram-ujemną, mikroaerofilną bakterię ze śluzówki pacjentów z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej żołądka [93], nazwaną później *Helicobacter pylori*. *H. pylori* jest jednym z najczęściej występujących u ludzi patogenów bakteryjnych. Częstość zakażenia w Polsce należy do najwyższych w Europie i w zależności od wieku sięga nawet 90% (w grupie osób powyżej 60 lat) [48, 49]. U większości osób zakażenie przebiega bezobjawowo, prowadząc do przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka, jednak u 10–20% zakażonych rozwija się choroba wrzodowa dwunastnicy lub żołądka, a u 1–3% rak żołądka lub chłoniak żołądka o mniejszej złośliwości [12, 51, 85].

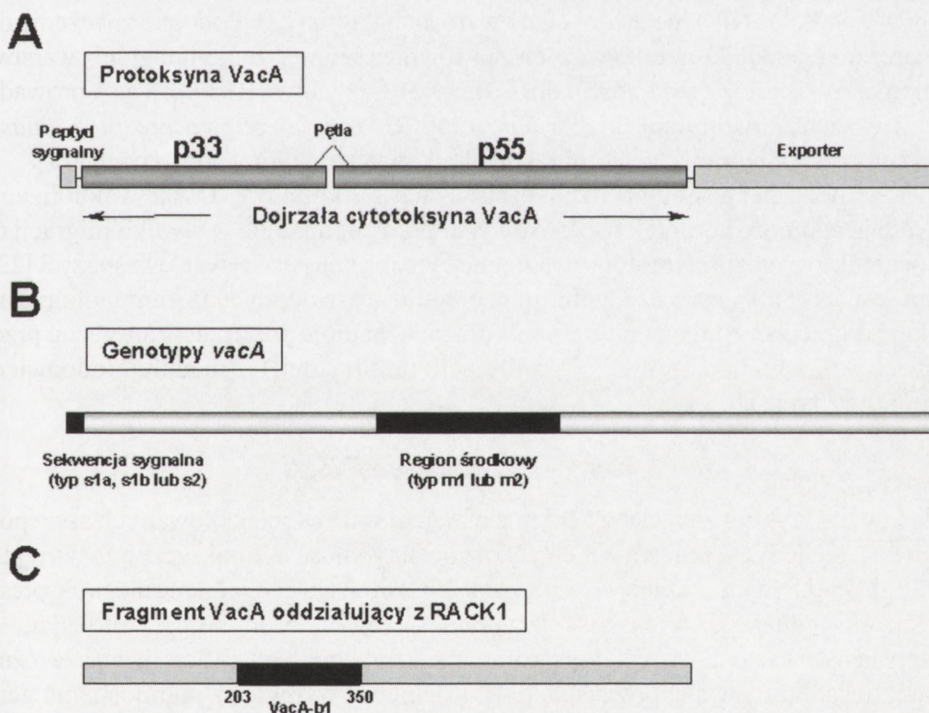
Szczepy *H. pylori* charakteryzuje szereg wspólnych czynników determinujących ich wirulencję; umożliwiających bakteriom zasiedlenie błony śluzowej żołądka oraz zdolność do przetrwania w kwaśnym środowisku treści żołądkowej [54, 85]. Wszystkie szczepy wytwarzają ureazę, enzym wydzielany przez bakterie w dużych ilościach, który rozkładając obecny w żołądku mocznik z uwolnieniem amoniaku, powoduje zobojętnienie kwaśnego środowiska soku żołądkowego w sąsiedztwie bakterii. Charakterystyczna dla wszystkich szczepów *H. pylori* jest również zdolność do poruszania się. Spiralny kształt bakterii, jak i obecność wici na jednym z biegunów umożliwiają jej przedostanie się przez warstwę śluzu na powierzchnię komórek nabłonkowych. Jako wspólne czynniki wirulencji wyróżnić można również liczne adhezyny, proteazy i fosfolipazy umożliwiające degradację śluzu żołądkowego i błony śluzowej oraz katalazę i dysmutazę nadtlenkową, które zapobiegają zniszczeniu bakterii w fagocytarnych wakuolach granulocytów [54, 85].

Już pierwsze badania nad wirulencją *H. pylori* wskazywały na olbrzymią różnorodność genetyczną tego drobnoustroju. Odkrycie, że niektóre z czynników bakteryjnych produkowane są tylko przez specyficzne szczepy *H. pylori*, rodziło nadzieję, że właśnie tą zmiennością będzie można wytłumaczyć tak zróżnicowany przebieg zakażenia. Wieloletnie i prowadzone w wielu ośrodkach badania potwierdziły słuszność takiego założenia, jednakże wskazały również, że działanie czynników bakteryjnych może być w dużym stopniu modyfikowane przez współwystępujące czynniki gospodarza i wpływy środowiskowe [13, 30, 39]. Obecnie uważa się, że w patogenezie zakażenia *H. pylori* kluczową rolę może odgrywać szczególna kombinacja osobniczo zmiennych cech gospodarza i szczepowo-specyficznych cech bakterii, warunkująca zaistnienie specyficznych oddziaływań na poziomie molekularnym.

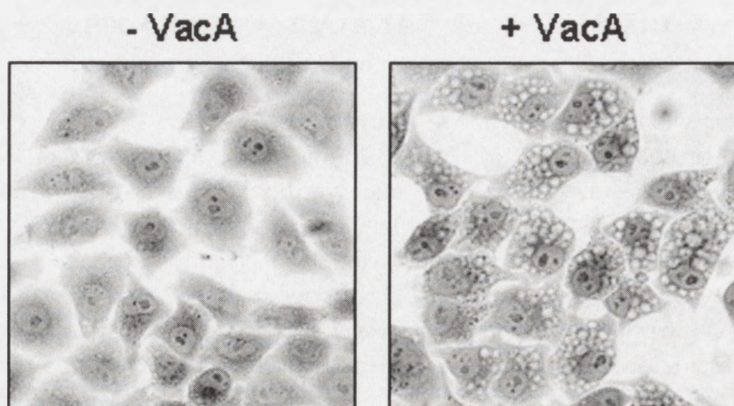
Różnice w wirulencji szczepów *H. pylori* wynikają głównie z obecności różnych alleli genów, a w tym obecności wyspy patogenności *cag* oraz różnych genotypów *vacA* czy *babA*. Produkty dwóch genów, *vacA* i *cagA*, jako pierwsze zaczęto korelować ze zwiększoną wirulencją szczepów *H. pylori*.

CYTOTOKSYNA WAKUOLIZUJĄCA VacA

Cytotoksyna wakuolizująca VacA syntetyzowana jest jako 140-kDa prekursor, a następnie, po proteolitycznym odcięciu 33-aminokwasowego peptydu sekwencji sygnałnej z N-końca oraz ~50-kDa C-końcowej domeny związanej z transportem toksyny przez błonę zewnętrzną, jest wydzielana z komórki bakteryjnej jako 88-kDa dojrzała toksyna [19, 64]. Cytotoksyna wydzielana z komórki składa się z dwóch podjednostek tworzących monomer, 33-kDa N-końcowej (p33) i 55-kDa C-końcowej (p55) (ryc. 1A) [56]. W formie natywnej, VacA występuje w postaci oligomerycznej struktury o sześć- lub siedmio-ramiennej symetrii, utrzymywanej przez oddziaływanie podjednostek p33 i p55 z sąsiednich monomerów [56, 89]. Efektywna internalizacja oraz aktywność wakuolizująca VacA zależy od ponownej monomeryzacji toksyny w kwaśnym lub zasadowym pH środowiska i tworzenia anionowo-selektywnych kanałów w błonach komórkowych [50, 87, 95]. Aktywność wakuolizującą VacA wykazano w supernatantach hodowli szczepów *H. pylori*, obserwując powstawanie wakuoli w wielu rodzajach komórek eukariotycznych *in vitro* (ryc. 2) [19, 22].



RYCINA 1. Schemat przedstawiający 140-kDa protoksynę VacA (A), regiony zmienności w *vacA*, determinujące różne genotypy cytotoksyny (B) oraz lokalizację fragmentu VacA-b1, oddziałującego z białkiem RACK 1. p33 (33-kDa) i p55 (55-kDa) oznaczają podjednostki dojrzałej cytotoksyny VacA; cyfry ograniczające fragment VacA-b1 w schemacie (C) odpowiadają kolejności aminokwasów w VacA ze szerepu 60190



RYCINA 2. Wakuolizacja komórek HeLa w obecności cytotoksyny VacA ze szczepu *H. pylori* 60190

Działanie VacA ma istotne znaczenie dla wydajniejszej kolonizacji i pozostawania *H. pylori* w zajmowanej niszy żołądkowej. Tworząc pory w błonie komórkowej, zwiększa jej przepuszczalność dla małych cząsteczek organicznych (w tym mocznika) i jonów (jak Fe^{3+} i Ni^{2+}) niezbędnych do wzrostu bakterii [22]. Podobne znaczenie dla dostarczania składników odżywczych ma również zmniejszenie integracji warstwy nabłonka. Wiążąc się z receptorem dla fosfatazy tyrozynowej RPTP β , VacA prowadzi do zwiększenia fosforylacji białka Git1 (ang. *G protein-coupled receptor kinase-interactor 1*) i odłączania się komórek nabłonkowych od błony podstawnej [19].

VacA może bezpośrednio działać niszcząco na komórkę. Obok wakuolizacji, powoduje apoptozę komórek nabłonkowych, prawdopodobnie w wyniku migracji do mitochondriów, gdzie stymuluje uwalnianie cytochromu c i aktywację kaspazy 3 [22]. VacA jest także toksyną o działaniu silnie modulującym odpowiedź immunologiczną: blokuje dojrzewanie fagosomów w makrofagach, hamuje prezentację antygeny przez limfocyty B, hamuje aktywację i proliferację limfocytów T i moduluje odpowiedź komórkową typu Th1 [19].

1. Genotypy cytotoksyny VacA

Gen *vacA* wykrywany jest w genomach niemal wszystkich izolowanych szczepów *H. pylori*, ale jedynie połowa z nich wykazuje aktywność cytotoksyczną *in vitro* [19, 22, 32, 39, 64]. Przypuszczano, że w pozostałych szczepach gen *vacA* nie ulega ekspresji. Wykazano jednak, że większość szczepów *H. pylori* produkuje cytotoksynę, w supernatantach ich hodowli wykrywano immunopozytywne białka VacA, jednakże różnią się one zasadniczo swą aktywnością [64]. Różnice te wynikają z polimorfizmu genu *vacA* i mozaikowatości jego organizacji [6, 64]. Niektóre regiony *vacA* charakteryzują się dużą konserwatywnością sekwencji nukleotydowej, zaś inne – wysoką zmiennością. Różnice obserwowane między szczepami dotyczą głównie dwóch regionów: 50 nukleotydów z 5'-części genu, kodujących drugą połowę sekwencji sygnałnej (allel s – ang. *signal sequence*) oraz 700-nukleotydowego odcinka części środkowej genu (allel m – ang. *middle region*) (ryc. 1B) [6].

Początkowo opisano występowanie trzech typów allelu s (s1a, s1b, s2) i dwóch typów allelu m (m1 i m2) [6]. Najwyższym poziomem cytotoksyczności *in vitro* charakteryzują się szczepy o genotypie s1/m1 (Tox⁺), zaś szczepy s2/m2 praktycznie nie mają aktywności wakuolizującej (Tox⁻). Stwierdzono, że peptyd sygnałowy toksyny o allelu s2 zakończony jest 12-aminokwasowym, silnie hydrofilowym segmentem, którego nie ma w allelu s1 [6]. Zastąpienie hydrofobowego końca s1 hydrofilowym fragmentem z końca s2 prowadzi do utraty właściwości wakuolizacji komórek HeLa, AGS i RK-13 [46]. Poza różnicami w sekwencji, szczepy Tox⁺ i Tox⁻ różnią się także poziomem transkrypcji genu *vacA*, która w szczepie s2/m2 była ok. 30-krotnie niższa niż w szczepie s1/m1 [26].

Analiza sekwencji sygnałnej *vacA* wskazywała na znamienne częstsze występowanie allelu s1a u pacjentów z chorobą wrzodową niż z zapaleniem śluzówki żołądka [6, 30, 32, 39, 71, 75, 84, 91]. Wydawało się, że oznaczanie genotypu *vacA* w szczepach *H. pylori* izolowanych od pacjentów może mieć ważne znaczenie praktyczne, pozwalające na określenie ryzyka rozwoju choroby wrzodowej i być może nowotworowej. Okazało się jednak, że krążące w różnych regionach geograficznych szczepy *H. pylori* różnią się genetycznie, a tym samym ocena ryzyka rozwoju choroby na podstawie genotypu *vacA*, jeśli w ogóle ma znaczenie, to jedynie ograniczone do lokalnej populacji.

2. Oddziaływania VacA z białkami gospodarza

Wykazano, że VacA oddziałuje z komórkami docelowymi, wiążąc się z takimi białkami powierzchniowymi, jak: receptor dla nabłonkowego czynnika wzrostu EGF czy receptor dla fosfatazy tyrozynowej RPTPβ [79, 94, 95]. W wiązaniu VacA do komórki zaangażowana jest podjednostka p55; ona również determinuje specyficzność komórkową cytotoksyny [22, 64]. Internalizacja VacA prowadzi do tworzenia w komórkach dużych wakuoli, powstających w wyniku masowego pęcznienia składników błonowych komórki, w późnych stadiach endocytozy [19, 22]. Badania nad wewnątrzkomórkową ekspresją *vacA* sugerowały, że tworzenie wakuoli jest konsekwencją oddziaływania podjednostki p33 (wraz ze 150-aminokwasowym fragmentem z N-końca podjednostki p55) z cytozolowymi białkami komórek gospodarza [21, 97].

Celem kolejnych badań stało się zatem poszukiwanie białek ludzkich wchodzących w bezpośrednie interakcje białko-białko z cytotoksyną VacA *H. pylori*. Zidentyfikowano białko RACK1, receptor dla aktywowanej kinazy białkowej C (PKC), jako oddziałujące z VacA w komórkach drożdży, w systemie dwu-hybrydowym [33]. W badaniach tych użyto fragmentów VacA do przeszukiwania biblioteki cDNA, uzyskanej z RNA izolowanego ze śluzówki żołądka pacjenta z objawową infekcją *H. pylori*. Fragment VacA-b1, wchodzący w interakcje z RACK1, obejmuje C-końcową część podjednostki p33 i 6 reszt aminokwasowych z podjednostki p55, a więc mieści się w obrębie minimalnego fragmentu VacA wykazującego działanie wakuolizujące wewnątrzkomórkowo (ryc. 1C) [21, 97]. Masa cząsteczkowa białka RACK1 wynosi 37-kDa i składa się ono z 317 aminokwasów, tworzących 7 powtórzeń zwanych motywami WD (Trp-Asp) [73]. Wykazano, że z białkiem VacA oddziałuje C-końcowy fragment RACK1, obejmujący powtórzenia WD5-WD7 [33].

RACK1 wiąże aktywną formę PKC β II i działa jako jej wewnątrzkomórkowy receptor [74]. Wiązanie to powoduje wzrost fosforylacji substratów PKC *in vivo*, prawdopodobnie przez stabilizowanie aktywnej formy kinazy [73]. Oprócz PKC, RACK1 wiąże szereg innych białek komórkowych, między innymi kinazę tyrozynową Src i podjednostkę β receptorów integrynowych [17, 47, 76]. Pokazano również, że po związaniu, RACK1 i PKC β II przemieszczają się razem do tej samej części komórki [74] oraz że różne białka mogą być jednocześnie wiązane z RACK1 [76]. Wydaje się więc, że to wielo-domenowe białko pełni funkcję białka wahadłowego (ang. *shuttle*), które doprowadza PKC w pobliże jej substratów, warunkując ich wydajniejszą fosforylację. Ponadto, RACK1 może służyć jako rodzaj platformy umożliwiającej kontakt i oddziaływanie pomiędzy białkami tworzącymi kompleksy sygnałne w komórce. Jak na razie, funkcjonalne znaczenie wiązania VacA z RACK1 nie jest znane. Jednakże, z racji pełnionej przez białko RACK1 funkcji w komórce, można spekulować, że stanowi ono centrum dla przekazywania sygnału uruchamianego w wyniku wewnątrzkomórkowego działania VacA.

W utrzymaniu spójności i integralności warstwy nabłonka zasadniczą rolę pełnią oddziaływania pomiędzy receptorami integrynowymi komórki i białkami adhezyjnymi macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), takimi jak laminina czy fibronektyna (FN) [24, 40]. FN wiąże się z integrynami głównie przez sekwencję zawierającą motyw RGD (Arg-Gly-Asp) [63]. Jej klasycznym receptorem jest integryna $\alpha_5\beta_1$. Aktywacja receptora integrynowego przez związanie z FN prowadzi do uruchomienia szlaków przekazywania sygnału w komórce, w których uczestniczą takie kinazy, jak: PKC, FAK (ang. *focal adhesion kinase*), Src i paksylina oraz Rho GTPaza [24, 44, 55]. Procesy te prowadzą do utworzenia kompleksów przylegania (ang. *focal adhesions*), polimeryzacji aktyny i przegrupowania cytoszkieletu aktynowego komórki.

Działanie VacA, wespół z innymi czynnikami wirulencji *H. pylori*, prowadzi do zniszczenia ciągłości i stabilności warstwy komórek nabłonka oraz narusza homeostazę śluzówki, zwiększając jej przepuszczalność, zmieniając potencjał błonowy, a także indukując apoptozę i odłączanie się komórek nabłonka od błony podstawnej [3, 22, 64, 66]. W konsekwencji dochodzi do przerwania bariery ochronnej, jaką stanowi nabłonek, i wyeksponowania białek ECM na bezpośredni kontakt z bakteriami.

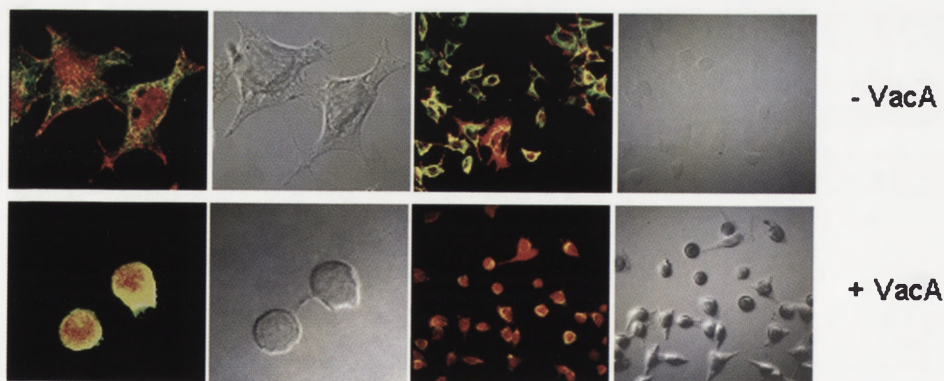
Wykazano, że VacA hamuje adhezję komórek HeLa do fibronektyny [34]. Cytotoksyna bezpośrednio wiąże się z FN *in vitro* [34], co w konsekwencji *in vivo* może prowadzić do ograniczenia dostępności FN dla receptorów integrynowych. Szereg patogenów bakteryjnych ma zdolność wiązania się z FN i wykorzystania jej interakcji z integryną $\alpha_5\beta_1$ do inwazji komórek gospodarza [77, 81]. Chociaż generalnie *H. pylori* uznawany jest za bakterię nieinwazyjną, wykazano, że z pewną wydajnością może wchodzić do komórek nabłonkowych żołądka i że proces ten jest zależny od podjednostki β_1 integryny oraz aktywności PKC [43, 67]. Zdolność do inwazji komórek nabłonka żołądka może mieć istotne znaczenie w patogenezie *H. pylori*, bowiem umożliwia ona bakteriom uniknięcie eliminacji przez układ immunologiczny gospodarza, co z kolei może skutkować ustanowieniem infekcji chronicznej. Wydaje się, że w procesie inwazji *H. pylori* uczestniczy VacA, jako że szczepy cytotoksyczne wykazują większe zdolności

inwazyjne i lepszą przeżywalność wewnątrz komórki niż szczepy nie mające tej aktywności [68, 77].

Polimeryzacja aktyny i reorganizacja cytoszkieletu komórki, zachodzące w wyniku stymulacji receptorów integrynowych, warunkują ruch i migrację komórek [10, 55]. Wykazano, że VacA hamuje tworzenie charakterystycznych wypustek błony komórkowej i lamelipodii, umożliwiających komórce poruszanie się, oraz prowadzi do zahamowania procesów polimeryzacji aktyny i tworzenia kompleksów przylegania (ryc. 3) [34]. Wyniki te sugerują, że działanie VacA, prowadzące do zahamowania reorganizacji cytoszkieletu i tworzenia wypustek komórkowych, może znacząco wpływać na procesy związane z odnową spójności uszkodzonego nabłonka czy zaleczaniem wrzodów, w których podstawową rolę pełni ruch komórki.

Jak dotąd, nie rozstrzygnięto jednoznacznie wpływu *H. pylori* na organizację cytoszkieletu zakażonych komórek. Podobnie jak w komórkach HeLa, VacA hamuje tworzenie włókien aktynowych również w komórkach Hep-2 i RGM1 [5, 60]. W innych badaniach, obserwowano co prawda wzrost liczby komórek o okrągłej morfologii i zaburzenia w organizacji ich cytoszkieletu, w obecności nadsączy hodowli *H. pylori*, jednakże efekt ten nie był wiązany z ekspresją *vacA* [11]. Natomiast w komórkach AGS zakażanych *H. pylori* stwierdzano indukcję polimeryzacji aktyny i tworzenia lamelipodii, niezależnie od cytotoksyczności zakażających szczepów [61, 86]. Wydaje się, że różnice w wynikach tych badań mogą być związane tak z użytą linią komórkową, szczepem *H. pylori*, jak i protokołem przeprowadzonych doświadczeń. Ważnym czynnikiem modyfikującym może być obecność surowicy cielejcej (FBS) w podłożu [61]. FBS oddziałuje z kompleksami sygnałnymi na brzegach komórki [42], może więc znacząco wpływać na wiązanie VacA z jej receptorami.

Ostatnio wykazano, że RACK1 jest ważnym czynnikiem regulującym organizację kompleksów przylegania oraz adhezję komórek do ECM, zależną od receptorów integrynowych [23, 36]. Nadprodukcja RACK1 prowadzi do zwiększenia ilości ognisk



RYCINA 3. Reorganizacja cytoszkieletu i zmiana morfologii komórek HeLa w obecności VacA ze szczepu *H. pylori* 60190. Podwójne barwienie immunologiczne i analiza pod mikroskopem konfokalnym; identyfikacja kompleksów przylegania paksyliną (zielony); barwienie filamentów aktynowych (czerwony)

przylegania, ilości włókien aktynowych, tworzenia wypustek komórkowych, a w konsekwencji do migracji komórek, czemu towarzyszy zwiększona fosforylacja FAK i paksyliny [36]. RACK1 lokalizuje się w tworzących się ogniskach przylegania w wypustkach komórkowych i reguluje adhezję i migrację komórek przez oddziaływanie z kinazą Src [20]. Do oddziaływania z VacA wystarczający jest fragment RACK1 obejmujący trzy C-końcowe motywy WD (WD5-WD7) tego białka [33]. Te same trzy motywy zaangażowane są w wiązanie domeny cytoplazmatycznej β podjednostki receptorów integrynowych [47], a w WD6 mapują się miejsca wiązania kinazy Src i PKC [17, 74]. Można więc spekulować, że oddziaływanie VacA z RACK1 będzie prowadziło do istotnych zaburzeń w adhezji komórek, tworzeniu ognisk przylegania i organizacji cytoszkieletu aktynowego.

Oprócz RACK1, w komórkach HeLa zidentyfikowano 54-kDa białko VIP54 jako potencjalnie oddziałujące z VacA w cytoplazmie [23]. Później okazało się, że VIP54 jest fragmentem 90-kDa białka WISH (ang. *WASP interacting SH3 protein*), wiążącego się z N-WASP (ang. *Wiskott-Aldrich syndrome protein*) przez swą domenę SH3 [14, 27]. WISH bierze udział w polimeryzacji aktyny oraz tworzeniu filopodii [22]. W komórce lokalizuje się w pobliżu połączeń międzykomórkowych w nabłonku, co może być istotne dla działania VacA w tym regionie zważywszy, że tak VacA, jak i CagA, inny czynnik wirulencji *H. pylori*, może prowadzić do dezintegracji kompleksów tworzących połączenia międzykomórkowe (ang. *tight junctions*) [3, 22], naruszając ciągłość warstwy nabłonkowej.

Adhezja komórek do FN indukuje rekrutację integryn β 1, kinaz FAK, PKC i Src oraz innych białek związanych z aktywacją integryn, do mikrodomen lipidowych w błonie komórkowej [44]. Uważa się, że mikrodomeny te służą jako rodzaj platform koordynujących przekazywanie sygnału od integryn do wnętrza komórki. Wykazano, że VacA wiąże się do mikrodomen lipidowych, co umożliwia jej internalizację do wnętrza komórki w procesie endocytozy [72]. Wydaje się więc, że VacA może wpływać na procesy przekazywania sygnału indukowanego przez aktywację receptorów integrynowych tak z zewnątrz, poprzez interakcję z fibronektyną, jak i z wnętrza komórki, oddziałując z białkami cytozolowymi, takimi jak RACK1 czy WISH. Działanie to prowadzi do zahamowania polimeryzacji aktyny i zmian w organizacji cytoszkieletu komórkowego. Można więc przypuszczać, że VacA będzie wpływać na funkcje komórki związane z jej cytoszkieletem, takie jak: ruch, migracja i proliferacja.

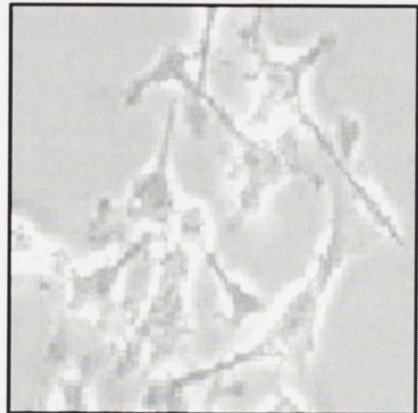
IMMUNODOMINUJĄCY ANTYGEN CagA

Początkowo aktywność VacA wiązano z występowaniem immunodominującego antygeny CagA (stąd też pochodzi jego nazwa; ang. *cytotoxin-associated antigen*) [18]. Obecnie wiadomo jednak, że chociaż występowanie obu białek jest wysoce skorelowane, ekspresja CagA nie jest konieczna dla indukcji wakuolizacji [90]. Gen *cagA* lokalizuje się w obrębie tzw. wyspy patogenności *cag* i służy m.in. jako marker obecności tego odcinka DNA, wielkości 35–40 tys. par zasad, w genomie *H. pylori*

[1, 16]. Pełna wyspa patogenności *cag* zawiera ok. 30 genów [16]. Oprócz CagA, kodowane są tu także inne białka związane ze zwiększoną wirulencją *H. pylori*. Wśród nich, białka odpowiedzialne za aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i pobudzenie komórek nabłonkowych do zwiększonego wydzielania interleukiny-8 (IL-8) oraz białka wchodzące w skład systemu sekrecji typu IV (SST4), biorącego udział w transporcie CagA do komórek gospodarza [1, 29, 59, 83]. Ostatnio wykazano, że obecność fragmentów peptydoglukanu *H. pylori* może prowadzić do aktywacji białka Nod1, będącego wewnątrzkomórkowym białkiem receptorowym, w sposób zależny od obecności wyspy patogenności *cag*. Indukcja białek NOD prowadzi do aktywacji NF- κ B i indukcji wydzielania IL-8. Przypuszcza się, że SST4 jest odpowiedzialny za transport także fragmentów peptydoglukanu do komórek gospodarza [92].

Zmienność CagA wiąże się z długością kodującego go genu. W zależności od szczepu *H. pylori*, masa białka CagA waha się od 128-kDa do 140-kDa. Różnice te wynikają z obecności różnej liczby powtórzeń 102 nukleotydów w regionie 3'-końca genu *cagA* [18]. W komórkach nabłonka CagA ulega fosforylacji przez kinazy tyrozynowe z rodziny Src [82]. Główny motyw fosforylacji, EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), lokalizuje się w 3'-części genu oraz w obrębie powtórzeń [82]. Stąd, liczba motywów EPIYA w genie waha się od 1 do 5 kopii. Ufosforylowane CagA, poprzez motywy fosforylacji oddziałuje z fosfatazą tyrozynową SHP-2 (ang. *Src homology 2 domain containing*), prowadząc do jej aktywacji [37, 38]. Dochodzi do uruchomienia przekazywania sygnału w szlaku kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*), co prowadzi do nieprawidłowej proliferacji komórek nabłonkowych żołądka, przegrupowania cytoszkieletu aktynowego komórki i w konsekwencji pojawienia się charakterystycznych zmian jej morfologii (fenotyp 'humming-bird' – ryc. 4) [9, 52, 78, 82].

Przyjęto uważać obecność genu *cagA* w genomie *H. pylori* za marker zwiększonej wirulencji szczepu, czy to przez bezpośrednie działanie białka CagA, czy też pośrednio jako wyznacznik obecności wyspy patogenności *cag* [9, 57]. Wykazano wysoką korelację między obecnością zakażenia szczepem *H. pylori cagA*⁺ a chorobą wrzodową i rakiem żołądka [15, 30, 32, 39, 58, 65, 71, 75, 84]. Zależności tej nie obserwowano w populacji azjatyckiej, ze względu na niezwykle rzadkie w tym regionie występowanie szczepów *cagA*⁻ [45, 62]. Ostatnio wykazano, że *cagA* w szczepach izolowanych w Azji Wschodniej różni się sekwencją nukleotydów w obrębie powtórzeń od izolowanych w krajach Europy Zachodniej, Ameryki Północnej i Australii [96, 99]. Po ufosforylowaniu, CagA o sekwencji specyficznej dla szczepów z Azji Wschodniej silnie wiązało SHP-2. Ponadto, wśród CagA ze szczepów z krajów Zacho-



Fenotyp "hummingbird"

RYCINA 4. Zmieniona morfologia komórek HeLa w obecności szczepu *H. pylori* produkującego białko CagA (ang. *hummingbird phenotype*)

dnich, o sile wiązania z SHP-2 i stopniu indukowanych zmian morfologicznych decydowała liczba miejsc fosforylacji [8, 18]. Tak więc ostatecznie, to polimorfizm w obrębie miejsca fosforylacji CagA, decydujący o poziomie wiązania SHP-2, może okazać się ważnym czynnikiem determinującym kliniczną manifestację zakażeń różnymi szczepami *H. pylori*.

ADHEZYNA BabA

Jednym z czynników niezbędnych do zasiedlania błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* jest zdolność do przylegania tej bakterii do komórek nabłonka. Przyleganie to wymaga z jednej strony obecności adhezyn na powierzchni komórki bakteryjnej, a z drugiej strony obecności swoistych receptorów, znajdujących się na powierzchni komórek gospodarza.

Antygen grupy krwi Lewis^b, obecny na powierzchni komórek nabłonkowych żołądka, jest jednym z receptorów komórkowych dla adhezyn *H. pylori* [41]. Zidentyfikowano dwa geny *H. pylori*: *babA* i *babB*, na podstawie podobieństwa produktów tych genów do białka wiążącego antygen Lewis^b [41]. Kodowane przez nie białka są niemal identyczne w swych N- i C-końcowych fragmentach, jednakże jedynie produkt genu *babA* jest niezbędny do wiązania Lewis^b [69]. Szczep *H. pylori* CCUG 17875 zawiera dwie kopie genu *babA*: *babA1* i *babA2* [41]. Funkcjonalnie aktywne białko BabA, o masie cząsteczkowej 78 kDa, kodowane jest przez gen *babA2*. Allel *babA1* różni się od *babA2* delecją 10 nukleotydów w obrębie sekwencji sygnałnej, która prowadzi do utraty kodonu inicjacji translacji [41]. Natomiast szczepy *H. pylori* 26695 i J99, których sekwencje nukleotydowe pełnych genomów zostały poznane, zawierają po jednej kopii *babA* [2, 88].

Wraz z BabB, BabA należy do rodziny białek powierzchniowych OMP (ang. *outer membrane proteins*), charakteryzujących się wysoką homologią N- i C-końcowych regionów oraz zmiennością w regionie centralnym [69]. Uważa się, że właśnie ten region decyduje o specyficzności w wiązaniu odpowiednich ligandów. Przy użyciu przeciwciał anti-BabA ScFv (ang. *single-chain fragment variable*) stwierdzono, że immunoreaktywne białko BabA produkowane jest przez blisko połowę szczepów *H. pylori* [35]. Szczepy te jednak, znacznie różnią się między sobą poziomem wiązania do antygeny Lewis^b *in vitro*. Jedną z hipotez tłumaczących te różnice zakłada zmienność sekwencji aminokwasowej BabA w regionie uczestniczącym w wiązaniu Lewis^b. Zgodnie z oczekiwaniami, wykazano obecność wielu polimorfizmów, głównie w regionie kodującym centralną część białka [35]. Jak dotąd jednak, nie udało się określić regionów białka odpowiedzialnych za aktywność adhezyjną BabA.

Obecność *babA2* jest silnie związana z obecnością *cagA* i allelu *s1m1* genu *vacA* w szczepie [28, 35, 98]. Wykazano, że geny te działają synergistycznie [98], a zakażenie tzw. „potrójnie-pozytywnym” szczepem *H. pylori* (*babA2/cagA⁺/vacA s1*) istotnie koreluje z wystąpieniem choroby wrzodowej dwunastnicy oraz raka żołądka [28]. Przypuszcza się, że dokładniejsze przyleganie bakterii do komórek nabłonka umożliwia

ich kolonizację z większą gęstością, a tym samym w większym stopniu naraża komórki na bezpośrednie działanie czynników wirulencji *H. pylori* [70, 80].

PODSUMOWANIE

Podsumowując dotychczasowy stan badań nad wirulencją *H. pylori* niewątpliwie można stwierdzić, że ryzyko rozwoju poważniejszych schorzeń górnego odcinka przewodu pokarmowego, towarzyszących zakażeniu *H. pylori*, rośnie wraz z liczbą czynników wirulencji akumulowanych w zakażającym szczepie. Brak uniwersalnego genotypu bakterii, który byłby związany z daną manifestacją kliniczną infekcji, można częściowo tłumaczyć obecnością mieszanych zakażeń, czyli jednoczesnej kolonizacji kilkoma szczepami *H. pylori*. W populacjach o wysokiej częstości zakażenia zjawisko to może dotyczyć nawet 70% zakażonych [25, 31, 32, 53]. Ponadto, *H. pylori* nieustannie zmienia swój genom w procesie adaptacji do warunków gospodarza [4, 7]. Szczególnie duże znaczenie przypisuje się obecnie indywidualnej zdolności gospodarza do odpowiedzi na infekcję. Tak więc, dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw zróżnicowanej klinicznej manifestacji zakażenia, począwszy od zapalenia śluzówki, poprzez chorobę wrzodową do raka żołądka, konieczne stało się prowadzenie badań nad zależnościami między *H. pylori* i komórką nabłonkową, na poziomie molekularnym.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKOPYANTS NS, CLIFTON SW, KERSULYTE D, CRABTREE JE, YOUREE BE, REECE A, BUKANOV NO, DRAZEK ES, ROE BA, BERG DE. Analysis of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 37–53.
- [2] ALM RA, LING LS, MOIR DT, KING BL, BROWN ED, DOIG PC, SMITH DR, NOONAN B, GUILD BC, DE JONGE BL, CARMEL G, TUMMINO PJ, CARUSO A, URIA-NICKELSEN M, MILLS DM, IVES C, GIBSON R, MERBERG D, MILLS SD, JIANG Q, TAYLOR DE, VOVIS GF, TRUST TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; **397**: 176–180.
- [3] AMIEVA MR, VOGELMANN R, COVACCI A, TOMPKINS LS, NELSON WJ, FALKOW S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 2003; **300**: 1430–1434.
- [4] ARAS RA, LEE Y, KIM S-K, ISRAEL D, PEEK RM, BLASER MJ. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. *J Infect Dis* 2003; **188**: 486–498.
- [5] ASHRON M, CANTET F, MAYO K, MEGRAUD F. Cytoskeletal rearrangements induced by *Helicobacter pylori* strains in epithelial cell culture: possible role of the cytotoxin. *Dig Dis Sci* 2000; **45**: 1774–1780.
- [6] ATHERTON JC, CAO P, PEEK RM, TUMMURU MKR, BLASER M, COVER TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17771–17777.
- [7] AVILES-JIMENEZ F, LETLEY DP, GONZALEZ-VALENCIA G, SALAMA N, TORRES J, ATHERTON JC. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. *J Bacteriol* 2004; **186**: 5182–5185.
- [8] AZUMA T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol* 2004; **39**: 97–103.

- [9] BACKERT S, SCHWARZ T, MIEHLKE S, KIRSCH C, SOMMER C, KWOK T, GERHARD M, GOEBEL UB, LEHN N, KOENIG W, MEYER TF. Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* 2004; **72**: 1043–1056.
- [10] BALLESTREM C, WEHRLE-HALLER B, HINZ B, IMHOF BA. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-direct cell migration. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 2999–3012.
- [11] BEBB JR, LETLEY DP, RHEAD JL, ATHERTON JC. *Helicobacter pylori* supernatants cause epithelial cytoskeletal disruption that is bacterial strain and epithelial cell line dependent but not toxin VacA dependent. *Infect Immun* 2003; **71**: 3623–3627.
- [12] BLASER MJ, BERG DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; **107**: 767–773.
- [13] BLASER M, ATHERTON JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; **113**: 321–333.
- [14] BOQUET P, RICCI V, GALMICHE A, GAUTHIER NC. Gastric cell apoptosis and *H. pylori*: has the main function of VacA finally been identified? *Trends Microbiol* 2003; **11**: 410–413.
- [15] BRITO CA, SILVA LM, JUCA N, LEAL NC, de SOUZA W, QUEIROZ D, CORDOBA F, SILVA NL. Prevalence of *cagA* and *vacA* genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastrointestinal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Gru* 2003; **98**: 817–821.
- [16] CENSINI S, LANGE C, XIANG Z, CRABTREE JE, GHIARA P, BORODOVSKY M, RAPPUOLI R, COVACCI A. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type 1-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 14648–14653.
- [17] CHANG BY, CHIANG M, CARTWRIGHT CA. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J Biol Chem* 2001; **276**: 20346–20356.
- [18] COVACCI A, CENSINI S, BUGNOLI M, PETRACCA R, BURRONI D, MACCHIA G, MASSONE A, PAPINI E, XIANG Z, FIGURA N, RAPPUOLI R. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5791–5795.
- [19] COVER TL, BLANKE SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Rev Microbiol* 2005; **3**: 320–332.
- [20] COX EA, BENNING D, DOAN AT, O'TOOLE T, HUTTENLOCHER A. RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 658–669.
- [21] de BERNARD M, BURRONI D, PAPINI E, RAPPUOLI R, TELFORD J, MONTECUCCO C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect Immun* 1998; **66**: 6014–6016.
- [22] de BERNARD M, CAPPON A, DEL GIUDICE G, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C. The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2004; **293**: 589–597.
- [23] de BERNARD M, MOSCHIONI M, NAPOLITANI G, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C. The VacA toxin of *Helicobacter pylori* identifies a new intermediate filament-interacting protein. *EMBO J* 2000; **19**: 48–56.
- [24] DEFILIPPI P, OLIVO C, VENTURINO M, DOLCE L, SILENGO L, TARONE G. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech* 1999; **47**: 67–78.
- [25] FIGUEIREDO C, VAN DOORN, NOGUEIRA LJ, SOARES JM, PINHO C, FIGUEIRA P. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol* 2001; **36**: 128–135.
- [26] FORSYTH MH, ATHERTON JC, BLASER MJ. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 1998; **66**: 3088–3094.
- [27] FUKUOKA M, SUETSUGU S, MIKI H, FUKAMI K, ENDO T, TAKENAWA T. A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol* 2001; **152**: 471–482.
- [28] GERHARD M, LEHN N, NEUMAYER N, BOREN T, RAD R, SCHEPP W, MIEHLKE S, CLASSEN M, PRINZ C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12778–12783.

- [29] GLOCKER E, LANGE C, COVACCI A, BERESWILL S, KIST M, PAHL HL. Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF- κ B activation. *Infect Immun* 1998; **66**: 2346–2348.
- [30] GONZALES CA, PENA S, CAPELLA G. Clinical usefulness of virulence factors of *Helicobacter pylori* as predictors of the outcome of infection. What is the evidence? *Scand J Gastroenterol* 2003; **9**: 905–915.
- [31] GONZALES-VALENCIA G, ATHERTON JC, MUNOZ O, DEHASA M, MADRANA DE LA GARZA A, TORRES J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect* 2000; **182**: 1450–1454.
- [32] HENNIG E, TRZECIAK L, REGUŁA J, BUTRUK E, OSTROWSKI J. VacA genotyping directly from gastric biopsies and estimation of mixed *Helicobacter pylori* infections in patients with duodenal ulcer and gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1999; **34**: 743–749.
- [33] HENNIG EE, BUTRUK E, OSTROWSKI J. RACK1 protein interacts with *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin – the yeast two-hybrid approach. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 103–110.
- [34] HENNIG EE, GODLEWSKI MM, BUTRUK E, OSTROWSKI J. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin interacts with fibronectin and alters HeLa cell adhesion and cytoskeletal organization *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; **44**: 143–150.
- [35] HENNIG EE, MERNAUGH R, EDL J, CAO P, COVER TL. Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA. *Infect Immun* 2004; **72**: 3429–3435.
- [36] HERMANTO U, ZONG CS, LI W, WANG L-H. RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 2345–2365.
- [37] HIGASHI H, NAGAYA A, TSUTSUMI R, YOKOYAMA K, FUJII Y, ISHIKAWA S, HIGUCHI M, TAKAHASHI A, KURASHIMA Y, TEISHIKATA Y, TANAKA S, AZUMA T, HATAKEYAMA M. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 17205–17216.
- [38] HIGASHI H, TSUTSUMI R, MUTO S, SUGIYAMA T, AZUMA T, ASAKA M, HATAKEYAMA M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002; **295**: 683–686.
- [39] HOCKER M, HOHENBERGER P. *Helicobacter pylori* virulence factors—one part of a big picture. *Lancet* 2003; **362**: 1231–1233.
- [40] HYNES RO. Integrins: bidirectional allosteric signaling machines. *Cell* 2002; **110**: 673–687.
- [41] ILVER D, ARNOVIST A, OGREN J, FRICK I-M, KERSULYTE D, INCECIK ET, BERG DE, COVACCI A, ENGSTRAND L, BOREN T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; **279**: 373–377.
- [42] KIMURA T, WADA A, NAKAYAMA M, OGUSHI K-I, NISHI Y, DE GUZMAN BB, MOSS J, HIRAYAMA T. High molecular weight factor in FCS inhibits *Helicobacter pylori* VacA-binding to its receptor, RPT β , on AZ-521. *Microbiol Immunol* 2003; **47**: 105–107.
- [43] KWOK T, BACKERT S, SCHWARZ H, BERGER J, MEYER TF. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect Immun* 2002; **70**: 2108–2120.
- [44] LACALLE RA, MIRA E, GOMEZ-MOUTON C, JIMENEZ-BARANDA S, MARTINEZ AC, MANES S. Specific SHP-2 partitioning in raft domains triggers integrin-mediated signaling via Rho activation. *J Cell Biol* 2002; **157**: 277–289.
- [45] LAI C-H, KUO C-H, CHEN Y-C, CHAO F-Y, POON S-K, CHANG C-S, WANG W-C. High prevalence of *cagA*- and *babA2*-positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3860–3862.
- [46] LETLEY DP, ATHERTON JC. Natural diversity in the N-terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol* 2000; **182**: 3278–3280.
- [47] LILIENTAL J, CHANG, DD. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin β subunit. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2379–2383.
- [48] ŁASZEWICZ W. Wyniki badań nad zakażeniem *Helicobacter pylori* (materiały wdrożeniowe). W: Koźłowska-Świątkowska E [red.]. Białystok, *Trans Humana* 2004.
- [49] MATYSIAK-BUDNIK T, KNAPIK Z, MEGRAUD F, LUBCZYŃSKA-KOWALSKA W, GOŚCINIAK G, BOUCHARD S, PRZONDO-MORDARSKA A, PONIEWIERKA E, HELEMEJKO M, KLEMOUS J. *Helicobacter pylori* infection in Eastern Europe. Seroprevalence in the Polish population of Lower Silesia. *Am J Gastroenterol* 1996; **91**: 2513–2515.

- [50] McCLAIN MS, SCHRAW W, RICCI V, BOQUET P, COVER TL. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 2000; **37**: 433–442.
- [51] MEGRAUD F. Impact of *Helicobacter pylori* virulence on the outcome of gastroduodenal diseases: lessons from the microbiologist. *Dig Dis* 2001; **19**: 99–103.
- [52] MeYER-TER-VEHN T, COVACCI A, KIST M, PAHL HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 16064–16072.
- [53] MOMYNALIEV K, SMIRNOVA O, KUDRYAVTSEVA L, GOVORUM V. *Helicobacter pylori* genotypes in Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; **22**: 573–574.
- [54] MONTECUCCO C, RAPPUOLI R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 457–466.
- [55] MOSTAFAVI-POUR Z, ASKARI JA, PARKINSON SJ, PARKER PJ, Ng TTC, HUMPHRIES MJ. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* 2003; **161**: 155–167.
- [56] NGUYEN VQ, CAPRIOLI RM, COVER TL. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun* 2001; **69**: 543–546.
- [57] NILSSON C, SILLEN A, ERIKSSON L, STRAND ML, ENROTH H, NORMARK S, FALK P, ENGSTRAND L. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infect Immun* 2003; **71**: 6573–6581.
- [58] NOMURA AM, PEREZ-PEREZ GI, LEE J, STEMMERMAN G, BLASER MJ. Relationship between *H. pylori* *cagA* status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 2002; **155**: 1054–1059.
- [59] ODENBREIT S, PULS J, SEDLMAIER B, GERLAND E, FISCHER W, HAAS R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; **287**: 1497–1500.
- [60] PAI R, COVER TL, TARNAWSKI AS. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**: 245–250.
- [61] PALOVUORI R, PERTTU A, YAN Y, KARTTUNEN R, ESKELINEN S, KARTTUNEN TJ. *Helicobacter pylori* induces formation of stress fibers and membrane ruffles in AGS cells by rac activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **269**: 247–253.
- [62] PAN ZJ, van der HULST RWM, FELLER M, XIAO SD, TYTGAT GNJ, DANKERT J, van der ENDE A. Equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 1344–1347.
- [63] PANKOV R, YAMADA KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3861–3863.
- [64] PAPINI E, ZORATTI M, COVER TL. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *Toxicin* 2001; **39**: 1757–1767.
- [65] PARK CY, KWAK M, GUTIERREZ O, GRAHAM DY, YAMAOKA Y. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 3336–3338.
- [66] PEEK RM. Intoxicated cells and stomach ulcers. *Nature Genetics* 2003; **33**: 328–330.
- [67] PETERSEN AM, KROGFELT KA. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **36**: 117–126.
- [68] PETERSEN AM, SORENSEN K, BLOM J, KROGFELT KA. Reduced intracellular survival of *Helicobacter pylori* *vacA* mutants in comparison with their wild-types indicates the role of VacA in pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; **30**: 103–108.
- [69] PRIDE DT, MEINERSMANN RJ, BLASER MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori* *babA* and *babB*. *Infect Immun* 2001; **69**: 1160–1171.
- [70] RAD R, GERHARD M, LANG R, SCHONIGER M, ROSCH T, SCHEPP W, BECKER I, WAGNER H, PRINZ C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* 2002; **168**: 3033–3041.
- [71] REGUŁA J, HENNIG E, BURZYKOWSKI T, ORŁOWSKA J, PRZYTUŁSKI K, DZIURKOWSKA-MAREK A, MAREK T, LEWANDOWSKA M, NOWAK A, BUTRUK E, OSTROWSKI J. Multivariate analysis of risk factors for development of duodenal ulcer in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Digestion* 2003; **67**: 25–31.

- [72] RICCI V, GALMICHE A, DOYE A, NECCHI V, SOLCIA E, BOQUET P. High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 3897–3909.
- [73] RON D, CHEN C-H, CALDWELL J, JAMIESON L, ORR E, MOCHLY-ROSEN D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the β subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 839–843.
- [74] RON D, JIANG Z, YAO L, VAGTS A, DIAMOND I, GORDON A. Coordinated movement of RACK1 with activated β IIPKC. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27039–27046.
- [75] SARIBASAK H, SALIH BA, YAMAOKA Y, SANDER E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1648–1651.
- [76] SCHECHTMAN D, MOCHLY-ROSEN D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 2001; **20**: 6339–6347.
- [77] SCHWARZ-LINEK U, WERNER JM, PICKFORD AR, GURUSIDDAPPA S, KIM JH, PILKA ES, BRIGGS JAG, GOUGH TS, HOOK M, CAMPEL ID, POTTS JR. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem β -zipper. *Nature* 2003; **423**: 177–181.
- [78] SELBACH M, MOESE S, HURWITZ R, HAUCK CR, MEYER TF, BACKERT S. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* 2002; **22**: 515–528.
- [79] SETO K, HAYASHI-KUWABARA Y, YONETA T, SUDA H, TAMAKI H. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett* 1998; **431**: 347–350.
- [80] SHEU B-S, SHEU S-M, YANG H-B, HUANG A-H, WU J-J. Host gastric expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in *babA2* genopositive infection. *Gut* 2003; **52**: 927–932.
- [81] STEBBINS CE, GALAN JE. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 2001; **412**: 701–705.
- [82] STEIN M, BAGNOLI F, HALENBECK R, RAPPUOLI R, FANTI WJ, COVACCI A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 971–980.
- [83] STEIN M, RAPPUOLI R, COVACCI A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 1263–1268.
- [84] STEPHENS JC, STEWART JA, FOLWELL AM, RATHBONE B. *Helicobacter pylori cagA* status, *vacA* genotypes and ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; **10**: 381–384.
- [85] STOICOV C, SAFFARI R, CAI X, HASYAGAR C, HOUGHTON JM. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene* 2004; **341**: 1–17.
- [86] SU B, CEPONIS JM, SHERMAN PM. Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 861–867.
- [87] SZABO I, BRUTSCHE S, TOMBOLA F, MOSCHIONI M, SATIN B, TELFORD JL, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C, PAPINI E, ZORATTI M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 1999; **18**: 5517–5527.
- [88] TOMB J-F, WHITE O, KERLAVAGE AR, CLAYTON RA, SUTTON GG, FLEISCHMANN RD, KETCHUM KA, KLENK HP, GILL S, DOUGHERTY BA, NELSON K, QUACKENBUSH J, ZHOU L, KIRKNESS EF, PETERSON S, LOFTUS B, RICHARDSON D, DODSON R, KHALAK HG, GLODEK A, MCKENNEY K, FITZGERALD LM, LEE N, ADAMS MD, HICKEY EK, BERG DE, GOCAYNE JD, UTTERBACK TR, PETERSON JD, KELLEY JM, COTTON MD, WEIDMAN JM, FUJII C, BOWMAN C, WATTHEY L, WALLIN E, HAYES WS, BORODOVSKY M, KARP PD, SMITH HO, FRASER CM, VENTER JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; **388**: 539–547.
- [89] TORRES VJ, MCCLAIN MS, COVER TL. Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA). *J Biol Chem* 2004; **279**: 2324–2331.
- [90] TUMMURU MKR, COVER TL, BLASER MJ. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; **62**: 2609–2613.
- [91] van DOORN LJ, FIGUEIREDO C, SANNA R, PENA S, MIDOLO P, NG EK, ATHERTON JC, BLASER MJ, QUINT W. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2597–2603.

- [92] VIALA J, CHAPUT C, BONECA IG, CARDONA A, GIRARDIN SE, MORAN AP, ATHMAN R, MEMET S, HUERRE MR, COYLE AJ, DISTEFANO PS, SANSONETTI PJ, LABIGNE A, BERTIN J, PHILPOTT DJ, FERRERO RL. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; **5**: 1166–1174.
- [93] WARREN JR, MARSHALL BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; **I**: 1273–1275.
- [94] YAHIRO K, NIIDOME T, HATAKEYAMA T, AOYAGI H, KURAZONO H, PADILLA PI, WADA A, HIRAYAMA T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 629–632.
- [95] YAHIRO K, NIIDOME T, KIMURA M, HATAKEYAMA T, AOYAGI H, KURAZONO H, IMAGAWA KI, WADA A, MOSS J, HIRAYAMA T. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase β . *J Biol Chem* 1999; **274**: 36693–36699.
- [96] YAMAOKA Y, KODAMA T, KASHIMA K, GRAHAM DY, SEPULVEDA AR. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2258–2263.
- [97] YE D, WILLHITE DC, BLANKE SR. Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem* 1999; **274**: 9277–9282.
- [98] ZAMBON C-F, NOVAGLIA F, BASSO D, RUGGE M, PLEBANI M. *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2003; **56**: 287–291.
- [99] ZHOU J, ZHANG J, XU C, HE L. *cagA* genotype and variants in Chinese *Helicobacter pylori* strains and relationships to gastroduodenal diseases. *J Med Microbiol* 2004; **53**: 231–235.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 30.01.2006 r.

Przyjęto: 22.02.2006 r.

2-781 Warszawa, ul. Roentgena 5

e-mail: hennige@coi.waw.pl

BREFELDINA A – WGLĄD W FUNKCJONOWANIE SYSTEMU BŁON KOMÓREK ROŚLINNYCH*

BREFELDIN A – AN INSIGHT INTO THE FUNCTIONING OF THE MEMBRANE SYSTEM OF PLANT CELLS

Paulina MŁYNKOWIAK*, Przemysław WOJTASZEK

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM, Poznań

Streszczenie: Prawidłowe funkcjonowanie komórek eukariotycznych jest ściśle zależne od sprawnego przemieszczania błon. Brefeldyna A – toksyna pochodzenia grzybowego, zakłóca to przemieszczanie umożliwiając eksperymentalny wgląd w organizację i współdziałanie różnych przedziałów systemu błonowego. Niedawno zidentyfikowano białka docelowe i miejsca działania BFA. W pracy analizujemy mechanizm działania brefeldyny A i wskazujemy szczególnie cechy systemu błon wewnętrznych komórek roślinnych, które przesądzą o swoistych reakcjach roślin na tę toksynę. Pokazujemy również, jak badania jednej z takich reakcji na BFA – wytwarzania przedziałów BFA, doprowadziły do odkrycia nowych aspektów procesu endocytozy u roślin. Wskazujemy wreszcie na implikacje, jakie niesie za sobą poznanie mechanizmów działania BFA dla najnowszych koncepcji dotyczących molekularnych i komórkowych mechanizmów polarnego transportu auksyn.

Słowa kluczowe: brefeldyna A (BFA), czynnik wymiany nukleotydów (GEF), endocytoza, polarny transport auksyn, system błon wewnętrznych.

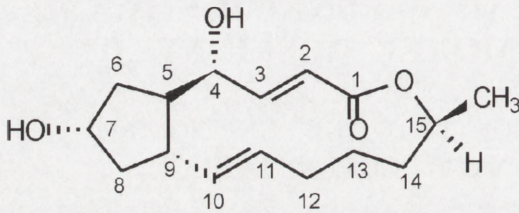
Summary: The functioning of eukaryotic cells is strictly dependent on the proper vesicular traffic within the cell's membrane system. Brefeldin A – a fungal toxin, disturbs this traffic, enabling an experimental insight into the organisation and co-operation of various elements of the system. Recently, BFA target proteins and sites of action have been identified. In this paper, we analyse the mechanism of BFA functioning and indicate those particular properties of the membrane system of plant cells that determine some of the reactions to BFA that are specific to plants. We demonstrate also, how the research into one of such reactions – the formation of BFA compartments has led to the discovery of novel aspects of endocytosis in plants. Finally, we identify implications, born from the recognition of the mechanisms of BFA action, for the modern concepts of molecular and cellular mechanisms of polar auxin transport.

Key words: brefeldin A, endocytosis, guanine nucleotide exchange factor, polar auxin transport, membrane system.

*Autorka jest studentką II roku studiów magisterskich biotechnologii. Autorzy dziękują Ministerstwu Edukacji i Nauki za wsparcie finansowe w ramach projektu badawczego 6 P04C 011 22.

Wykaz skrótów: AG – aparat Golgiego; ARF – czynnik ADP-rybozylacji; BFA – brefeldyna A; COP – kompleks białek opłaszczających pęcherzyki transportujące; ER – retikulum endoplazmatyczne; ERGIC (ang. *ER-Golgi Intermediate Compartment*) – przedział pośredni; VTC (ang. *Vesicular-Tubular Cluster*) – struktura pęcherzykowo-rurkowa; GEF – czynnik wymiany nukleotydów; PAT – polarny transport auksyn; PIN – mutant *Arabidopsis* PIN-FORMED; SNARE (ang. *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Adaptor protein REceptor*) – białka pośredniczące w fuzji błon; TGN (ang. *trans-Golgi network*) – sieć *trans* aparatu Golgiego.

Wyodrębnienie, przez błony biologiczne, określonych przedziałów o swoistych właściwościach i funkcjach jest cechą charakterystyczną komórek eukariotycznych. Komunikacja pomiędzy różnymi elementami systemu błon wewnętrznych jest jednym



RYCINA 1. Wzór strukturalny brefeldyny A

z kluczowych warunków prawidłowego funkcjonowania komórki. Brefeldyna A (BFA) zakłóca przemieszczanie błon przez aparat Golgiego i transport pęcherzykowy [19]. Ta lipofilna toksyna pochodzenia grzybowego, o strukturze makrocyklicznego pierścienia laktonowego (ryc. 1), wyizolowana została po raz pierwszy z *Penicillium brefeldianum*. Dzięki swym właści-

wościom brefeldyna A stała się znakomitym narzędziem badawczym umożliwiając poznanie wielu szczegółów organizacji i działania systemu błon wewnętrznych. Choć BFA wykorzystywana jest do badań od około 40 lat, dopiero w 1992 r. zidentyfikowano białka docelowe [20, 36], a w 2003 r. ustalono mechanizm jej działania [61]. Tu chcemy wskazać na niektóre implikacje, jakie odkrycia te mają dla poznania mechanizmów polarnego transportu auksyn oraz endocytozy u roślin.

SYSTEM BŁON WEWNĘTRZNYCH I JEGO CECHY SZCZEGÓLNE U ROŚLIN

System błon wewnętrznych, jego organizacja i elementy składowe są podobne we wszystkich komórkach eukariotycznych. Organelle systemu: retikulum endoplazmatyczne (ER), aparat Golgiego (AG), wakuole/lizosomy, endosomy, otoczka jądrowa i błona komórkowa, włączana weń coraz częściej, komunikują się nieustannie ze sobą przede wszystkim za pomocą transportu pęcherzykowego [40] (przegląd literatury w języku polskim w [64, 65]). Wyróżnia się zwykle dwie główne drogi transportu w obrębie systemu: szlak sekrecyjny, prowadzący od ER poprzez AG i sieć *trans* aparatu Golgiego (TGN) do błony komórkowej oraz szlak endocytozy, wiodący od błony komórkowej poprzez różne formy endosomów do lizosomów/wakuol. Analizując dokładnie funkcjonowanie systemu błon wewnętrznych zauważyć można pewne cechy szczególne, charakterystyczne dla różnych grup organizmów eukariotycznych. Przypuszcza się, że wynikają one z przyjęcia odmiennej strategii utrzymania wewnętrznej homeostazy

składu chemicznego [57, 77, 78] przez otoczone ścianą komórki roślin i grzybów oraz „nagie” komórki zwierzęce, co prowadzi do odmiennych sposobów wzrostu komórek [6]. Duże znaczenie ma również rodzaj makrocząsteczek transportowanych w obrębie systemu. O ile bowiem w komórkach zwierzęcych dominującym składnikiem pęcherzyków przemieszczających się w obrębie np. szlaku sekrecyjnego są białka, o tyle w przypadku roślin szlakiem tym transportowane są przede wszystkim polisacharydy budujące ściany komórkowe, z grupy pektyn i hemiceluloz. Do cech wyróżniających system błon wewnętrznych komórek roślinnych zaliczyć należy [14, 27, 34, 40, 56, 63, 74]:

- 1) organizację aparatu Golgiego w postaci dużej liczby ruchliwych stosów (diktiosomów) w odróżnieniu od pojedynczego, statycznego i ulokowanego centralnie aparatu Golgiego w komórce zwierzęcej;
- 2) występowanie co najmniej dwóch funkcjonalnych typów wakuol: litycznych i gromadzących białka;
- 3) prawdopodobny brak przedziału pośredniego, podobnego do zwierzęcego ERGIC, pomiędzy ER i AG;
- 4) występowanie ruchliwych miejsc eksportu białek z ER do diktiosomów;
- 5) wykorzystanie filamentów aktynowych, a nie mikrotubul do pozycjonowania i przemieszczania organelli i pęcherzyków transportowych;
- 6) utrzymanie integralności organelli, zwłaszcza stosów AG, w trakcie cytokinezy.

TRANSPORT PĘCHERZYKOWY – GŁÓWNY SZLAK KOMUNIKACYJNY SYSTEMU BŁON WEWNĘTRZNYCH

Transport pęcherzykowy polega na formowaniu pęcherzyków z błony przedziału donorowego, które przemieszczają się, by złączyć z błoną przedziału akceptorowego [51]. Formowane pęcherzyki pobierają cargo (ładunek), które uwalniane jest do światła przedziału docelowego. Kształtowanie pęcherzyków zachodzi z udziałem cytozolowych białek opłaszczających, których typ wyznacza w pewnym stopniu szlak wędrówki okrytych nimi pęcherzyków. Białka te konieczne są do uformowania pęcherzyków i po ich oddzieleniu od błony donorowej zwykle oddysocjują odsłaniając transbłonowe białka SNARE. Wzajemne oddziaływania białek v-SNARE w błonie pęcherzyka z białkami t-SNARE w błonie akceptorowej umożliwiają fuzję błon obu przedziałów.

W transporcie postępowym (anterogradowym), w którym makrocząsteczki są eksportowane z ER, pośredniczą pęcherzyki opłaszczone białkami COPII. Przyłączenie białek COPII po stronie cytozolowej błony ER wymaga obecności białka Sar1 o aktywności GTPazowej oraz właściwego czynnika wymiany nukleotydów, w tym przypadku Sec12 (przegląd w [65]). Białka te zidentyfikowano początkowo u drożdży, a ich odpowiedniki wykryto u wszystkich grup organizmów, w tym roślin [40, 51]. U ssaków odpączkujące z ER pęcherzyki ulegają fuzji tworząc polimorficzną strukturę pęcherzykowo-rurkową ulokowaną pomiędzy ER i AG, określaną jako VTC lub ERGIC. U roślin poszczególne diktiosomy AG przemieszczają się przy udziale systemu aktynomiozynowego wzdłuż struktur ER [11, 52], wymieniając się materiałem [13], w tym

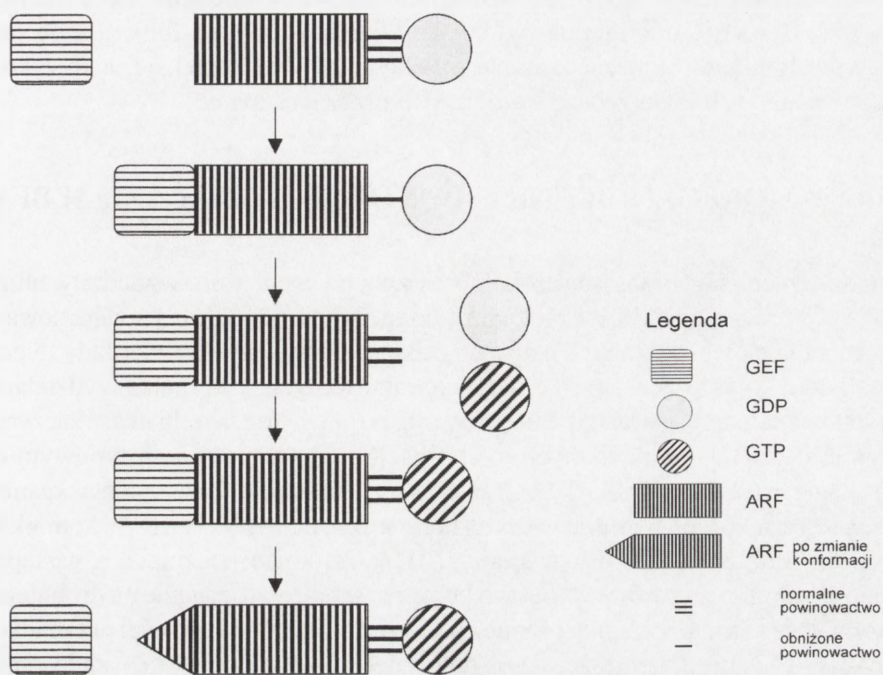
bezpośrednio odbierając w cysternach *cis* diktiosomów cargo niesione przez pęcherzyki oddysocjujące z ER. W obecności brefeldyny A markery cystern *cis* przemieszczają się do ER [68]. Doświadczenia z wykorzystaniem techniki FRAP wykazały natomiast, że powstawanie nowych cystern *cis* związane jest z fuzją wychodzących z ER pęcherzyków opłaszczonych COPII z pęcherzykami COPI wychodzącymi z AG (przegląd w [75]).

Białka opłaszczające typu COPI związane są z transportem wstecznym (retrogradowym) pęcherzyków z AG do ER oraz w obrębie AG. Asocjację podjednostek kompleksu opłaszczającego COPI indukuje czynnik ARF – małe białko o aktywności GTPazowej, który bierze również udział w formowaniu pęcherzyków pokrytych klatryną [82]. Aktywacji ARF dokonują białka ARF-GEF – czynniki wymiany nukleotydów guaninowych. U ssaków znanych jest przynajmniej sześć białek ARF oraz kilka podobnych strukturalnie białek o zróżnicowanej lokalizacji tkankowej. W komórkach drożdży znaleziono tylko trzy, a u *Arabidopsis* 9 do 12 genów *ARF* [41]. Również białka ARF-GEF są dość zróżnicowane. Dotychczas u ssaków opisano pięć odrębnych rodzin ARF-GEF [21], natomiast 8 czynników ARF-GEF *Arabidopsis* zaliczono jedynie do dwóch rodzin: klasy GNOM/Gea1/2p/GBF1 i klasy BIG/Sec7p [41]. W odróżnieniu od czynników ssaczy, wszystkie ARF-GEF *Arabidopsis* należą do tzw. dużych białek ARF-GEF i są przeważnie wrażliwe na BFA.

MECHANIZM DZIAŁANIA BREFELDYNY A

Jak wspomniano, na początku lat 90. XX w. stwierdzono, że białkami docelowymi dla BFA są białka GEF. Ustalenie, dlaczego nie wszystkie białka AFR-GEF są wrażliwe na BFA i jaki jest właściwie mechanizm działania toksyny, zajęło kolejne 10 lat. Różne białka ARF działają w różnych etapach sekrecji i endocytozy, a każde z nich wymaga współpracy swoistego czynnika wymiany nukleotydów. Zdolność wymiany nukleotydów związana jest z obecnością w białkach GEF domeny Sec7 (lub struktury homologicznej do Sec7) [39]. Jej struktura została określona [15, 49], jak również struktury kompleksu białkowego ARF-domena Sec7 [31] i kompleksu niosącego nukleotyd ARF:GDP-domena Sec7 [8]. Proponowany mechanizm działania GEF jest następujący (ryc. 2): białko GEF rozpoznaje kompleks ARF:GDP i wiążąc się z nim obniża powinowactwo ARF do GDP. Po uwolnieniu GDP wolne miejsce zajmuje GTP. Prowadzi to do zmiany konformacji białka ARF i odłączenia białka GEF, które może oddziaływać z kolejnym białkiem G [58]. Ten ostatni etap jest kluczowy, kontroluje wymianę nukleotydów i uwolnienie aktywnej formy ARF:GTP. Jeżeli GTP nie może przyłączyć się do białka G, może dojść do utworzenia nieprawidłowego kompleksu ARF-GEF. Ponieważ poziom ekspresji białek GEF w komórce jest niższy niż odpowiadających im ARF, już mała ilość wolnego białka G jest wystarczająca do związania całej endogennej puli białek GEF. W efekcie prowadzi to do pośredniego zahamowania endogennej aktywacji białek G.

Porównując różne białka GEF stwierdzono, że na BFA wrażliwe są białka zaliczane do klas tzw. dużych białek GEF, natomiast małe białka GEF, takie jak np. ludzki czynnik ARNO, są najczęściej niewrażliwe [15]. Szczegółowa analiza porównawcza dużych



RYCINA 2. Mechanizm działania czynnika wymiany nukleotydów (GEF)

białek Gea1/2 z białkami ARNO wykazała, że pozycje aminokwasów odpowiadające za wrażliwość na toksynę skupiają się w rejonie domeny Sec7 zachodzącym na nie lub znajdującym się bardzo blisko miejsca wiązania ARF1 [58]. Dokładny obszar działania brefeldyny A określono niedawno, dzięki rozszyfrowaniu struktury kompleksu ARF: GDP-BFA-domena Sec7 [61]. Powstało wobec tego pytanie, czy mechanizm inhibicyjnego działania BFA może polegać na współzawodnictwie BFA i ARF o miejsce wiązania w domenie Sec7? Jeżeli by tak było, mielibyśmy do czynienia z sytuacją, w której mała cząsteczka (taka jak BFA) może skutecznie blokować oddziaływanie białko:białko. Czy jednak mała cząsteczka może wiązać się z białkiem docelowym w sposób kompetycyjny z takim samym powinowactwem jak białkowy partner tego białka? Dokładniejsze analizy wykazały, że o wiele skuteczniejsze może być hamowanie niekompetycyjne, w którym mała cząsteczka wiąże się odwracalnie z już utworzonym kompleksem białkowym w określonym miejscu, innym od tego, gdzie przyłączył się białkowy partner. Daje to dwójakie korzyści: współzawodnictwo między białkiem a małą cząsteczką jest o wiele bardziej efektywnym mechanizmem regulatorowym, a stężenie inhibitora niekompetycyjnego wymagane do jego włączenia się w utworzony kompleks białkowy jest niższe niż stężenie inhibitora kompetycyjnego wymagane do nasycenia białka mającego utworzyć kompleks. I rzeczywiście, dalsze doświadczenia wykazały, że BFA raczej stabilizuje kompleks ARF:GDP-Sec7 niż przeciwdziała jego formowaniu [58]. BFA jest więc inhibitorem niekompetycyjnym: wiążąc się odwracalnie z kompleksem utworzonym pomiędzy

ARF:GDP i domeną Sec7 (ARF:GDP-BFA-domena Sec7) uniemożliwia dysocjację nukleotydu. Powstaje endogenna pula ARF:GDP-GEF, która funkcjonuje jako „negatywny dominant” unieruchamiając białko GEF w kompleksie, a to z kolei uniemożliwia aktywację innych cząsteczek ARF przez ten czynnik.

ZMIANY MORFOLOGICZNE INDUKOWANE DZIAŁANIEM BFA

Jednymi z pierwszych obserwacji komórek zwierzęcych, które wzbudziły zainteresowanie wykorzystaniem BFA w biologii komórki, były dane pokazujące zahamowanie wydzielania białek we wczesnych etapach szlaku sekrecyjnego. Potwierdziły to dane mikroskopowe, wskazujące, że w komórkach traktowanych BFA białka wydzielane i białka błonowe są zatrzymywane w ER. Co więcej, po pewnym czasie białka te zaczynają wykazywać cechy białek poddanych modyfikacjom potranslacyjnym typowym dla aparatu Golgiego (przegląd w [43]). Stąd też wywnioskowano, że BFA zmienia organizację i przemieszczanie błon w AG, a w dalszej konsekwencji również w ER. W komórkach zwierzęcych traktowanych BFA cysterny AG początkowo pęcznieją, a następnie pojawiają się długie, rurkowate wypustki, które z czasem, po rozpadzie na drobniejsze pęcherzyki, łączą się z ER; zanika również przedział VTC. W większości przypadków markery sieci TGN nie przemieszczają się do ER, jednakże struktura TGN, endosomów i lizosomów ulega pewnym zmianom. Ta reakcja na BFA sugeruje, że forma organelli jest wynikiem subtelnej równowagi utrzymywanej dzięki białkom cyto-zolowym gromadzącym się na powierzchniach błon. BFA zakłóca tę równowagę hamując gromadzenie się białek opłaszczających. Proces zaczyna się od dysocjacji podjednostek β kompleksu COPI już 20 sekund po dodaniu BFA w temperaturze 37°C i jest zakończony po upływie 1–2 minut [16, 69]. Wówczas organelle przekształcają się w dynamiczny system rurek występujących w mniejszej lub większej rozciągłości w całej komórce. Ponieważ białka COP wiążą się odwracalnie z błonami, nieopłaszczone rurki są prawdopodobnie trwałą formą struktur błonowych. Każda organella ma nie tylko charakterystyczny zestaw białek opłaszczających, ale również swoisty sygnał przyłączenia/odłączenia tychże białek. Sygnał ten może się zmieniać, gdy rozpoczyna się przekształcanie struktury organelli. Opłaszczenie błon lub jego brak to jeden z elementów, który różnicuje dwa typy przemieszczania błon w komórce: homotypowy i heterotypowy (tab. 1) [43].

Mechanizm pośredniczący w transporcie pęcherzykowym jest podobny u wszystkich eukariontów [52]. Stąd BFA działa tak samo, w podobnych miejscach i wywiera podobny efekt podstawowy w postaci zmiany organizacji przemieszczania błon u zwierząt, grzybów i roślin. Jednakże, ze względu na odmienną organizację systemu błon wewnętrznych (patrz wyżej), reakcje komórek roślinnych wykazują pewne cechy swoiste. W komórkach roślin najwcześniej obserwowane są zaburzenia w wydzielaniu białek, przy czym efekt ten jest wyraźnie swoisty dla różnych gatunków roślin i zależy od stężenia i czasu działania BFA. Zmiany morfologiczne w systemie błon wewnętrznych obserwuje się przy stężeniach rzędu dziesiątek $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy zaburzenia transportu białek na szlaku sekrecyjnym pojawiają się już przy stężeniach 0,3 $\mu\text{g/ml}$ [34, 59]. W

TABELA 1. Porównanie dwóch typów transportu błon w komórce

Transport homotypowy	Transport heterotypowy
Nie wymaga opłaszczenia białkowego	Wymaga przyłączenia białek COP do błon oraz obecności białek ARF
Powstające rurki umożliwiają bezpośrednie połączenie pomiędzy błoną donorową i docelową	Powstaje system odrębnych pęcherzyków przenoszących ładunek pomiędzy błoną donorową i docelową – nie dochodzi do bezpośredniego połączenia obu błon
Niewrażliwy na działanie BFA	Wrażliwy na działanie BFA

komórkach ssaków białka ARF-GEF z rodzin wrażliwych na BFA wykazują swoistość działania zależną od miejsca lokalizacji [80]. Na przykład, GBF1 ułożone są w cysternach *cis* AG, podczas gdy BIG1 i BIG2 gromadzą się głównie w TGN. Działanie BFA w komórkach nadprodukcujących białka BIG2 prowadzi do stabilizacji procesu gromadzenia białek AP1 na błonach TGN, podczas gdy rekrutacja białek COPI na błonach cystern *cis* AG jest zakłócona [71]. Podobną sytuację obserwuje się w komórkach roślinnych, stąd sądzi się, że BFA może, bezpośrednio lub pośrednio, wpływać na funkcjonowanie innych szlaków transportowych, prowadząc do całkowitego zahamowania wędrówki białek [22, 72].

Funkcjonowanie szlaku sekrecyjnego opiera się na transporcie postępowym pęcherzyków opłaszczonych białkami COPII. Tymczasem, analizując efekty działania BFA na wewnątrzkomórkową lokalizację białek COPI w komórkach BY-2 tytoniu (*Nicotiana tabacum*) wykazano, że, podobnie jak w komórkach zwierzęcych [44], najwcześniej obserwowanym procesem jest utrata cytozolowych białek opłaszczających COPI z AG [62]. Jak więc pogodzić te pozornie sprzeczne fakty? Wydaje się, że decydujące znaczenie ma tutaj równowaga pomiędzy szlakami transportowymi przebiegającymi w przeciwnych kierunkach. Biorąc pod uwagę cargo niesione przez pęcherzyki transportowe można zauważyć, że cechą szczególną komórek roślinnych jest znaczące przesunięcie równowagi na korzyść szlaku sekrecyjnego, którym wędrują na zewnątrz składniki ścian komórkowych, przede wszystkim polisacharydy [34, 77, 78]. Stąd też można przypuszczać, że znacznie intensywniejszy „obrót” białkami opłaszczającymi, jak i lipidami błon sprzyja zwiększonej wrażliwości tego szlaku na działanie BFA. Co więcej, można również sądzić, że ta nierównowaga szlaków transportowych, jak również zróżnicowana wrażliwość białek GEF na BFA są źródłem odmiennych reakcji morfologicznych na BFA, obserwowanych wyłącznie w komórkach roślinnych, u których działanie BFA prowadzi do powstania jednej lub dwóch charakterystycznych struktur: przedziału hybrydowego ER-Golgi oraz tzw. przedziałów BFA (ang. *BFA compartments*).

Hybryda ER-Golgi

W komórkach ssaków utrata białek opłaszczających COPI prowadzi do wzmoczonego formowania nieopłaszczonych rurek błonowych wzdłuż mikrotubul [38, 69]. Po 10

minutach działania toksyny rurki są już niewidoczne. Ulegają fuzji z ER. W komórkach roślinnych BFA nie prowadzi do gwałtownej zmiany struktury AG. Diktiosomy są wstępnie utrzymywane w normalnym ułożeniu i kształcie, oprócz widocznego ubytku cystern po stronie *cis* [62]. Stopniowo jednak cysterny AG łączą się z ER, formując hybrydę ER-Golgi. W niektórych przypadkach pozostałości cystern mogą się łączyć bocznie z innymi diktiosomami, tworząc przerośnięte kompleksy AG, które dopiero później zlewają się w hybrydę z ER [62]. Z kolei w niektórych typach komórek powstawanie hybrydy ER-Golgi następuje przez zlewanie się indywidualnych cystern AG z ER i przez pewien czas można obserwować diktiosomy z przyłączonymi cysternami hybrydowymi [51]. Przypuszcza się, że zmiany te odzwierciedlają wysoką stabilność strukturalną indywidualnych diktiosomów, która jest konieczna w warunkach częstego i szybkiego ich przemieszczania w obrębie komórki [11, 52]. Co ciekawe, w odróżnieniu od zwierząt, w komórkach roślinnych proces zlewania się błon ER i aparatu Golgiego jest niezależny od obecności funkcjonalnego cytoszkieletu [13].

Przedział BFA

Znacznie wcześniejsze są opisy drugiej ze struktur, pokazujące proces dezintegracji diktiosomów w zlepek rurek i pęcherzyków, określane jako przedział BFA. Analiza wędrówki białek przez system błon wewnętrznych w komórkach poddanych działaniu BFA wykazała, że białka uwalniane z aparatu Golgiego gromadzą się w dużych skupiskach błonowych zlokalizowanych w okolicach jądra komórkowego. Owe skupiska rozmieszczone są w jak największych odległościach od siebie, po przeciwnych stronach jądra i zgodnie z osią symetrii komórki [67]. Obecnie interpretuje się te wczesne wyniki jako proces horyzontalnego rozszczepienia diktiosomów w reakcji na BFA. Większość cystern zostaje zaabsorbowana przez ER z przejściowym uformowaniem hybrydy ER-Golgi. Natomiast cysterny *trans* diktiosomów oraz pęcherzyki TGN zlewają się formując przedział BFA. Pozycja rozszczepienia stosów Golgiego jest wyznaczana przez cysterny niezaangażowane w pączkowanie pęcherzyków opłaszczonych białkami COPI.

W minimalnej, trudnej do zaobserwowania, formie przedział BFA zawiera tylko TGN i jedną lub dwie cysterny *trans*-Golgiego. Jego formowanie zaczyna się znacznie szybciej od innych zmian wywołanych BFA, gdyż obecność przedziałów BFA można odnotować równolegle z pozornie nienaruszonymi stosami AG [29, 62]. Elementy ER nie biorą udziału w tworzeniu tej struktury [37]. Obserwacje te sugerują, że musi istnieć jakieś dodatkowe źródło błon zasilające tworzenie przedziału BFA. Ostatnie badania wskazują, że tworzenie przedziału BFA zasila szlak endocytozy [2, 53] (patrz również niżej). Przedział BFA jest więc hybrydą cysterny *trans* AG:TGN:endosomy, zwykle o określonej organizacji przestrzennej: w centrum znajdują się pęcherzyki szlaku endocytozy, a na peryferiach zlokalizowane są pozostałości stosów AG rozmieszczone w sposób spolaryzowany z cysternami *trans* zwróconymi w stronę przedziału BFA (przegląd w [66]). W komórkach roślin formowanie dużych przedziałów BFA jest unikatową cechą jedynie pewnych typów komórek. Struktury te są formowane w komórkach merystematycznych korzenia, natomiast brak ich w komórkach sekrecyjnych czapeczki korzenia, komórkach metaksylemu i w innych komórkach korzenia

aktywnych w procesie egzocytozy. Jedynym wyjątkiem są komórki epidermalne zaangażowane w formowanie włósników korzeniowych [2].

„BFA, CZYLI TAM I Z POWROTEM” – ENDOCYTOZA U ROŚLIN

Do niedawna kwestionowano istnienie endocytozy u roślin [35]. Głównym argumentem w dyskusjach było 1) występowanie ścian komórkowych oraz 2) względy mechaniczne, a więc trudności w formowaniu pęcherzyków transportowych w warunkach ciśnienia turgorowego przyciskającego błonę komórkową do ścian. Jednakże wykorzystanie nowych technik obrazowania, a przede wszystkim nowych sond, takich jak: białko GFP lub jego pochodne, asocjujących z błoną barwników z rodziny FM, steroli roślinnych znakowanych filipiną czy wreszcie BFA, w przekonujący sposób wykazały, że endocytoza jest zjawiskiem powszechnym u roślin, a mechanizmy endocytozy są dość zbliżone do tych, jakie znane są w komórkach zwierzęcych (przegląd w [1, 66]). Ostatnio wykazano również, że nawet w komórkach charakteryzujących się wysokim turgorem, takich jak komórki szparkowe, endocytoza jest zjawiskiem konstytutywnym i że tą drogą pobierane są barwniki markerowe oraz wycofywane białka błony komórkowej [47].

Zastosowanie BFA w odpowiednich stężeniach umożliwiło selektywne hamowanie bądź to procesów wydzielania białek na zewnątrz komórek roślinnych, bądź też pobierania substancji z zewnątrz czy wycofywania białek błony komórkowej. Badania te wykazały, że w obecności BFA internalizacji endocytotycznej i gromadzeniu się w przedziałach BFA ulegają m.in. przENOŚniki wypływu auksyn z rodziny PIN (patrz niżej) [28, 29], H⁺-ATP-aza błony komórkowej [2, 29], a także peryferyczne białko ARG1 błony komórkowej powiązane z odpowiedzią roślin na bodźce grawitacyjne [12]. Zjawisko to jest charakterystyczne wyłącznie dla roślin, gdyż u zwierząt nie obserwuje się internalizacji markerów błony komórkowej pod wpływem BFA. Co więcej, odmycie BFA w obecności cykloheksimidu [29] prowadziło do powrotu niektórych białek do błon komórkowych, co uznać można za bezpośrednią wskazówkę na istnienie u roślin pełnego systemu umożliwiającego krążenie białek błon komórkowych. Podobne obserwacje dotyczą steroli roślinnych błon komórkowych [32]. Doświadczenia na korzeniach *Arabidopsis* pokazują również, że o ile akumulację białek błony komórkowej w przedziałach BFA można zaobserwować już po ok. 30 min działania toksyny, o tyle nagromadzenie wewnątrz komórki białek wydzielanych szlakiem sekrecyjnym możliwe jest dopiero przy długotrwałej, bo trwającej co najmniej 24 godz., obecności BFA [81]. Wydaje się, że wspomniane wyżej doświadczenia jasno dowodzą, że endocytoza i endosomy przyczyniają się do formowania przedziałów BFA.

Jednym z nieoczekiwanych efektów pośrednich działania BFA, swoistym, jak się wydaje, dla komórek roślinnych jest obecność w pęcherzykach endocytotycznych i dalej w przedziałach BFA pektyn ściany komórkowej, w tym homogalakturnanu o niskim stopniu estryfikacji (do 40%), czy dimerów ramnogalakturnanu II skompleksowanych z jonami

boranowymi [2]. Dotychczas bowiem uważano, że makrocząsteczki wydzielane są do ścian komórkowych nieodwracalnie i że jedynie produkty ich degradacji, takie jak: oligosacharyny lub elicytory, mogą powrócić do protoplastu jako cząsteczki sygnałowe. Oba wspomniane polimery pektynowe powstają jedynie w ścianach komórkowych, a nie są syntezowane w szlaku sekrecyjnym. Przykładowo, homogalakuronan jest wytwarzany w aparacie Golgiego w postaci polimeru silnie estryfikowanego (zwykle powyżej 80%), a usuwanie grup metylowych następuje w ścianach przy udziale metyloesterazy pektyn [77]. Co ważniejsze, traktowanie protoplastów BFA prowadzi do pojawienia się przedziałów BFA niezawierających polimerów pektynowych [2]. W roślinach pozbawionych boru, gwałtownie wzrasta zawartość pektyn w ścianach komórkowych i nie obserwuje się internalizacji deestryfikowanego homogalakuronanu czy kompleksów boranowych z ramnogalakuronanem II [79]. Ponieważ polimery pektynowe odgrywają kluczową rolę w determinacji wytrzymałości mechanicznej i porowatości ścian, można przypuszczać, że ich kontrolowana internalizacja jest istotnym czynnikiem regulatorowym wpływającym na wzrost, polarność i morfogenezę komórek i tkanek roślinnych.

Endocytoza jest procesem zależnym od funkcjonowania cytoszkieletu komórki [60, 66]. W komórkach zwierzęcych, nienaruszony cytoszkielet aktynowy warunkuje prawidłowy przebieg endocytozy [23]. Najnowsze obserwacje sugerują, że podobna sytuacja ma miejsce u roślin. Depolimeryzacja aktyny przez latrunkulinę B czy cytochalazynę D hamuje formowanie dużych przedziałów BFA [2] lub krążenie steroli błon komórkowych [32]. Podobnie, endocytozę hamuje zastosowanie inhibitora miozyny [3]. Natomiast depolimeryzacja mikrotubul przez oryzalinę nie wpływa na endocytozę pektyn [2].

OPOWIEŚĆ O SKRZATACH – BFA I POLARNY TRANSPORT AUKSYN

Auksyny są uważane za integrator wzrostu i rozwoju roślin działający podobnie jak morfogeny u zwierząt [9, 24]. Zidentyfikowano je prawie 80 lat temu, ale dopiero w ostatnich latach zaczynamy poznawać mechanizmy molekularne działania tych hormonów [17, 18, 19, 42]. Decydujące znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania auksyn ma ich polarny transport (PAT) w roślinach. Ponieważ został on wyczerpująco omówiony w wielu pracach przeglądowych (np. [24, 45, 50, 55], w literaturze polskiej [7, 76]), tu ograniczymy się jedynie do przedstawienia zagadnień związanych bezpośrednio z BFA lub takich, które ujrzały światło dzienne już po publikacji wymienionych prac.

W połowie lat 80. XX w. pojawiły się pierwsze wyniki badań przesiewowych mutantów *A. thaliana* o zaburzonych procesach embriogenezy [48]. Jednym z nich był mutant *GNOM* (znany również jako *EMB30*) o szerokiej gamie fenotypów, których wspólną cechą był brak merystemu korzeniowego i, najczęściej, nieprawidłowo wykształcone tkanki wzdłuż osi góra-dół [46, 70]. W późniejszym okresie stwierdzono również, że *GNOM* działa także w dalszych etapach rozwoju roślin, wpływając na funkcjonowanie merystemu korzeniowego i organizację zawiązków korzeni bocznych [30]. Mutację zlokalizowano w genie kodującym białko podobne do białka Sec7 z drożdży

[70], które zidentyfikowano jako białko ARF-GEF [73]. Białko GNOM należy do klasy GNOM/Gea1/2p/GBF1 [41]. W komórkach *Arabidopsis* jest ono związane z cytoplazmatyczną stroną endosomu i jest niezbędne do utrzymania integralności endosomów [28]. Różni się tym samym od innych białek tej klasy, które u drożdży i zwierząt związane są z transportem w obrębie AG i pomiędzy ER i AG.

Fenotyp mutantów *GNOM* można wywołać w warunkach *in vitro* traktując zarodki wysokimi stężeniami auksyn lub inhibitorów PAT [33]. To sugeruje, że GNOM może w jakiś sposób brać udział w transporcie auksyn. I rzeczywiście, stwierdzono, że w mutantach *gnom* zakłócona jest lokalizacja PIN1 – potencjalnych białek wspomagających wpływ auksyn [29]. W genomie *Arabidopsis* znajduje się 8 genów kodujących białka PIN, z czego 5 zostało dotąd w pełni scharakteryzowanych. Wszystkie one, a w szczególności PIN1 [26], wpływają na transport auksyn, choć ich funkcja jako przenośników auksyn lub regulatorów transportu, jest nadal niejasna [55]. Najbardziej uderzającą cechą białek PIN jest ich ścisła lokalizacja, nie tylko na poziomie tkankowym, ale również w określonych domenach błony komórkowej w zależności od położenia komórki w ciele rośliny [10, 24, 55]. Sugeruje się wobec tego, że lokalizacja białek PIN nie jest zależna od struktury tych białek, ale jest określana przez ukierunkowany transport tych białek do wybranych rejonów komórki [55]. Co ciekawsze, najnowsze dane zdają się świadczyć, że same auksyny są jednym z czynników regulujących ekspresję genów i dystrybucję białek PIN [10, 54].

U roślin BFA indukuje powstawanie pęcherzykowych agregatów zwanych przedziałami BFA. Gromadzą się w nich zarówno białka PIN1, jak i GNOM [29, 73], co sugeruje, że białka PIN1 krążą pomiędzy błoną komórkową a przedziałami endosomalnymi w pęcherzykach wzdłuż cytoszkieletu aktynowego [4, 29, 50]. Tak więc uszkodzenie GNOM zakłóca wewnątrzkomórkowy transport pęcherzykowy, co prowadzi do zaburzeń w krążeniu PIN1 i w konsekwencji do rozregulowania transportu auksyn. Analiza porównawcza sekwencji białek ARF-GEF opornych i wrażliwych na działanie BFA wskazała reszty aminokwasowe krytyczne dla odporności białek. Prosta substytucja aminokwasowa (zamiana ⁶⁹⁶M na L w obrębie domeny Sec7) w genie *GNOM* okazała się wystarczająca do uzyskania mutantów niewrażliwych na toksynę, a tym samym wykazujących nienaruszony transport auksyn i prawidłowe krążenie białka PIN1 w obecności BFA [28].

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie brefeldyny A przyczyniło się do rozwikłania wielu zagadek funkcjonowania systemu błon roślin. W niniejszej pracy wskazaliśmy jedynie niektóre z nich, według naszej opinii najciekawsze. Szczególnie ostatnie z omawianych, a związane z polarnym transportem auksyn zainspirowały niektórych badaczy do sformułowania bardzo interesującej, acz dość niezwykłej hipotezy, zgodnie z którą PAT w wielu aspektach przypomina proces wydzielania neuroprzekaźników przez synapsy nerwowe zwierząt [4, 5]. Wspomniano już wcześniej, że auksyny mogą spełniać rolę analogiczną do morfogenów zwierząt [9, 25]. Można mieć nadzieję, że brefeldyna A okaże się przydatna również w badaniach zmierzających do wyjaśnienia i rozpoznania tych fascynujących problemów.

LITERATURA

- [1] BAHAJI A, CORNEJO MJ, ORTIZ-ZAPATER E, CONTRERAS I, ANIENTO F. Uptake of endocytic markers by rice cells: variations related to the growth phase. *Eur J Cell Biol* 2001; **80**: 178–186.
- [2] BALUŠKA F, HLAVACKA A, ŠAMAJ J, PALME K, ROBINSON DG, MATOH T, MCCURDY DW, MENZEL D, VOLKMANN D. F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells insights from brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol* 2002; **130**: 422–431.
- [3] BALUŠKA F, ŠAMAJ J, HLAVACKA A, KENDRICK-JONES J, VOLKMANN D. Actin-dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices. *J Exp Bot* 2004; **55**: 463–473.
- [4] BALUŠKA F, ŠAMAJ J, MENZEL D. Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 282–285.
- [5] BALUŠKA F, VOLKMANN D, MENZEL D. Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 106–111.
- [6] BALUŠKA F, WOJTASZEK P, VOLKMANN D, BARLOW P. The architecture of polarized cell growth: the unique status of elongating plant cells. *BioEssays* 2003; **25**: 569–576.
- [7] BANASIAK AS. Polarny transport auksyny – hipotezy i odkrycia. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 605–618.
- [8] BÉRAUD-DUFOUR S, ROBINEAU S, CHARDIN P, PARIS S, CHABRE M, CHERFILS J, ANTONNY B. A glutamic finger in the guanine exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the β-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J* 1998; **17**: 3651–3659.
- [9] BHALERAO RP, BENNETT MJ. The case for morphogens in plants. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 939–943.
- [10] BLILOU I, WILDWATER M, WILLEMSEN V, PAPONOV I, FRIML J, HEIDSTRA R, AIDA M, PALME K, SCHERES B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 2005; **433**: 39–44.
- [11] BOEVINK P, OPARKA K, CRUZ SS, MARTIN B, BETTERIDGE A, HAWES C. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* 1998; **15**: 441–447.
- [12] BOONSIRICHAH K, SEDBROOK JC, CHEN R, GILROY S, MASSON P. Altered response to gravity is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalinization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell* 2003; **15**: 2612–2625.
- [13] BRANDIZZI F, SNAPP E, ROBERTS A, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, HAWES C. Membrane protein transport between the ER and Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* 2002; **14**: 1293–1309.
- [14] CARTER CJ, BEDNAREK SY, RAIKHEL NV. Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 701–707.
- [15] CHERFILS J, MENETREY J, MATHIEU M, LE BRAS G, ROBINEAU S, BÉRAUD-DUFOUR S, ANTONNY B, CHARDIN P. Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* 1998; **392**: 101–105.
- [16] DASCHER C, BALCH WE. Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1437–1448.
- [17] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 441–445.
- [18] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, WEIJERS D, LECHNER E, YAMADA M, HOBBIE L, EHRISMANN JS, JÜRGENS G, ESTELLE M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 2005; **9**: 109–119.
- [19] DINTER A, BERGER EG. Golgi disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 1998; **109**: 571–590.
- [20] DONALDSON JG, FINAZZI D, KLAUSNER RD. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 1992; **360**: 350–352.
- [21] DONALDSON JG, JACKSON CL. Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 475–482.
- [22] DRIIOUICH A, ZHANG GF, STAEHELIN LA. Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*). *Plant Physiol* 1993; **101**: 1363–1373.
- [23] ENGQVIST-GOLDSTEIN AEY, DRUBIN DG. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 287–332.
- [24] FRIML J. Auxin transport – shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 7–12.
- [25] FRIML J, VIETEN A, SAUER M, WEIJERS D, SCHWARZ H, HAMANN T, OFFRINGA R, JÜRGENS G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 2003; **426**: 147–153.

- [26] GÄLWEILER L, GUAN C, MÜLLER A, WISMAN E, MENDGEN K, YEPHREMOV A, PALME K. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 1998; **282**: 2226–2230.
- [27] GELDNER N. The plant endosomal system – its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta* 2004; **219**: 547–560.
- [28] GELDNER N, ANDERS N, WOLTERS H, KEICHER J, KOMBERGER W, MULLER P, DELBARRE A, UEDA T, NAKANO A, JÜRGENS G. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling auxin transport and auxin-dependent plant growth. *Cell* 2003; **112**: 219–230.
- [29] GELDNER N, FRIML J, STIERHOF Y-D, JÜRGENS G, PALME K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; **413**: 425–428.
- [30] GELDNER N, RICHTER S, VIETEN A, MARQUARDT S, TORRES-RUIZ RA, MAYER U, JÜRGENS G. Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* 2004; **131**: 389–400.
- [31] GOLDBERG J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 1998; **95**: 237–248.
- [32] GREBE M, XU J, MOBIUS W, UEDA T, NAKANO A, GEUZE HJ, ROOK MB, SCHERES B. *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 2003; **13**: 1378–1387.
- [33] HADFI K, SPETH V, NAUHAUS G. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* 1998; **125**: 879–887.
- [34] HANTON SL, BORTOLOTTI LE, RENNA L, STEFANO G, BRANDIZZI F. Crossing the divide – transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plants. *Traffic* 2005; **6**: 267–277.
- [35] HAWES C, CROOKS K, COLEMAN J, SATIAT-JEUNEMAITRE B. Endocytosis in plants: fact or artifact? *Plant Cell Environ* 1995; **18**: 1245–1252.
- [36] HELMS JB, ROTHMAN JE. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 1992; **360**: 352–354.
- [37] HENDERSON J, SATIAT-JEUNEMAITRE B, NAPIER R, HAWES C. Brefeldin A-induced disassembly of the Golgi apparatus is followed by disruption of the endoplasmic reticulum in plant cells. *J Exp Bot* 1994; **45**: 1347–1351.
- [38] HESS MW, MÜLLER M, DEBBAGE PL, VETTERLEIN M, PAVELKA M. Cryopreparation provides new insight into the effect of brefeldin A on the structure of the HepG2 Golgi apparatus. *J Struct Biol* 2000; **130**: 63–72.
- [39] JACKSON CL, CASANOVA JE. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 60–67.
- [40] JÜRGENS G. Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 481–504.
- [41] JÜRGENS G, GELDNER N. Protein secretion in plants: from the *trans*-Golgi network to the outer space. *Traffic* 2002; **3**: 605–613.
- [42] KĘPINSKI S, LEYSER O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 446–451.
- [43] KLAUSNER RD, DONALDSON JG, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992; **116**: 1071–1080.
- [44] KREIS TE, LOWE M, PEPPERKOK R. COPs regulating membrane traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 677–706.
- [45] LEYSER O. Auxin distribution and plant pattern formation: how many angles can dance on the point of PIN? *Cell* 2005; **121**: 819–822.
- [46] MAYER U, BÜTTNER G, JÜRGENS G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 1993; **117**: 149–162.
- [47] MECKEL T, HURST AC, THIEL G, HOMANN U. Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K⁺-channel KAT1. *Plant J* 2004; **39**: 182–194.
- [48] MEINKE DW. Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: Analysis of mutants with a wide range of lethal phenotypes. *Theor Appl Genet* 1985; **69**: 543–552.
- [49] MOSESSEVA E, GULBIS JM, GOLDBERG J. Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human armo and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* 1998; **92**: 415–423.

- [50] MUDAY GK, PEER WA, MURPHY AS. Vesicular cycling mechanisms that control auxin transport polarity. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 301–304.
- [51] NEBENFÜHR A. Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, RabS and SNAREs. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 507–512.
- [52] NEBENFÜHR A, STAEHELIN LA. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 160–167.
- [53] NEBENFÜHR A, RITZENTHALER C, ROBINSON DG. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* 2002; **130**: 1102–1108.
- [54] PACIOREK T, ZAŽIMALOVÁ E, RUTHARDT N, PETRÁŠEK J, STIERHOF Y-D, KLEINE-VEHN J, MORRIS DA, EMANS N, JÜRGENS G, GELDNER N, FRIML J. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 2005; **435**: 1251–1256.
- [55] PAPONOV IA, TEALE WD, TREBAR M, BLILOU I, PALME K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 170–177.
- [56] PAVELKA M, ROBINSON DG. The Golgi apparatus in mammalian and higher plant cells: a comparison. [w] Robinson DG [red.] The Golgi apparatus and the plant secretory pathway. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2003: 16–35.
- [57] PETERS WS, HAGEMANN W, TOMOS DA. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in „soft” plant tissues. *Comp Biochem Physiol Part A* 2000; **125**: 151–167.
- [58] PEYROCHE A, ANNTONY B, ROBINEAU S, ACKER J, CHERFILS J, JACKSON CL. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 1999; **3**: 275–285.
- [59] PIMPL P, HANTON SL, TAYLOR JP, PINTO-DA SILVA LL, DENECKE J. The GTPase ARF1 controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell* 2003; **15**: 1242–1256.
- [60] QUALMANN B, KESSELS MM, KELLY RB. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 2000; **150**: F111–F116.
- [61] RENAULT L, GUIBERT B, CHERFILS J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 2003; **426**: 525–530.
- [62] RITZENTHALER C, NEBENFÜHR A, MOVAFEGHI A, STUSSI-GARAUD C, BEHNIA L, PIMPL P, STAEHELIN LA, ROBINSON DG. Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* 2002; **14**: 237–261.
- [63] ROBINSON DG, RITZENTHALER C. Perturbation of ER-Golgi vesicle trafficking. [w] Robinson DG [red.] The Golgi apparatus and the plant secretory pathway. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2003: 193–207.
- [64] ROSZEK K, GNIOT-SZULŻYCKA J. Wielorakie formy pęcherzyków ołączonych klatryną w zależnym od receptorów transporcie i segregacji makromolekuł. *Post Biol Kom* 2001; **27**: 295–314.
- [65] ROSZEK K, GNIOT-SZULŻYCKA J. Transport makromolekuł pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego. Rola pęcherzyków COPI i COPII oraz przedziału pośredniego. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 443–465.
- [66] ŠAMAJ J, BALUŠKA F, VOIGT B, SCHLICHT M, VOLKMANN D, MENZEL D. Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 2004; **135**: 1150–1161.
- [67] SATIAT-JEUNEMAÎTRE B, COLE L, BOURET T, HOWARD R, HAWES C. Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J Microsc* 1996; **181**: 162–177.
- [68] SAINT-JORE CM, EVINS J, BATOKO H, BRANDIZZI F, MOORE I, HAWES C. Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant J* 2002; **29**: 661–678.
- [69] SCIAKY N, PRESLEY J, SMITH C, ZAAL KJM, COLE N, MOREIRA JE, TERASAKI M, SIGGIA E, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1137–1155.
- [70] SHEVELL DE, LEU WM, GILLMOR CS, XIA G, FELDMANN KA, CHUA N-H. EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* 1994; **77**: 1051–1062.
- [71] SHINOTSUKA C, YOSHIDA Y, KAWAMOTO K, TAKASTU H, NAKAYAMA K. Overexpression of an ADP-ribosylation factor – guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9468–9473.

- [72] STAEHELIN LA, DRIOUICH A. Brefeldin A effects in plants: Are different Golgi responses caused by different sites of action? *Plant Physiol* 1997; **114**: 401–403.
- [73] STEINMANN T, GELDNER N, GREBE M, MANGOLD S, JACKSON CL, PARIS S, GÄLWEILER L, PALME K, JÜRGENS G. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 1999; **286**: 316–318.
- [74] SURPIN M, RAIKHEL N. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 100–109.
- [75] WARD TH, BRANDIZZI F. Dynamics of proteins in Golgi membranes: comparisons between mammalian and plant cells highlighted by photobleaching techniques. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 172–185.
- [76] WIŚNIEWSKA J, TYBURSKI J, TRETYN A. Polarny transport auksyny – przełom w badaniach? *Post Biol Kom* 2004; **31**: 9–24.
- [77] WOJTASZEK P. Genes and plant cell walls: a difficult relationship. *Biol Rev (Cambridge)* 2000; **75**: 437–475.
- [78] WOJTASZEK P. Czym jest komórka roślinna? Miejsce ścian komórkowych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 315–324.
- [79] YU Q, HLAVACKA A, MATOH T, VOLKMANN D, MENZEL D, GOLDBACH HE, BALUŠKA F. Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. *Plant Physiol* 2002; **130**: 415–421.
- [80] ZHAO X, LASELL TK, MELANCON P. Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 119–133.
- [81] ZHENG H, KUNST L, HAWES C, MOORE I. A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant J* 2004; **37**: 398–414.
- [82] ZHU Y, TRAUB LM, KORNFELDS S. ADP-ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sites on Golgi membranes. *Mol Biol Cell* 1998; **9**: 1323–1337.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 11.07.2005 r.

Przyjęto: 23.11.2005 r.

ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

e-mail: przemow@ibch.poznan.pl

ROLA APOPTOZY W KOMÓRKACH JAJNIKA*

THE ROLE OF APOPTOSIS IN THE OVARIAN CELLS

Agnieszka BRODOWSKA, Maria LASZCZYŃSKA*,
Andrzej STARCZEWSKI

Klinika Rozrodczości i Ginekologii oraz *Zakład i Katedra Histologii i Embriologii,
Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

Streszczenie: W jajniku kobiety w okresie reprodukcyjnym apoptoza jest naturalnym, fizjologicznym procesem i dotyczy przede wszystkim komórek ziarnistych i komórek osłonki. Proces ten decyduje o ilości pęcherzyków jajnikowych, wydolności ciała żółtego, a tym samym wpływa na steroidogenezę. Jest też przyczyną menopauzy. Apoptoza zapewnia homeostazę komórek jajnika i zabezpiecza je przed nieprawidłowym funkcjonowaniem. Dokładne poznanie mechanizmów regulujących apoptozę w jajniku ludzkim ma także wymiar kliniczny. Być może pozwoli na optymalizację postępowania w zaburzeniach endokrynologicznych i w chorobach nowotworowych.

Słowa kluczowe: jajnik, apoptoza, czynniki hamujące i indukujące, kaspazy, menopauza.

Summary: Apoptosis is a natural process at reproductive age in women. It concerns granulosa and thecal cells. This process influences on the amount of ovarian follicles, luteal corpus sufficiency and on steroidogenesis and menopause. Apoptosis cause normal function and homeostasis of ovarian cells. Knowing the mechanism of apoptosis in human ovary to optimize the management in endocrinologia disorders and neoplasms.

Key words: ovary, apoptosis, inducing and inhibiting factors, caspases, menopause.

Wykaz skrótów: **IGF-1** (*insulin growth factor*) – insulinowy czynnik wzrostu, **EGF** (*epithelial growth factor*) – nabłonkowy czynnik wzrostu, **TGF- α** (*transforming growth factor α*) – transformujący czynnik wzrostu α , **bFGF** (*basic fibroblastic growth factor*) – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów, **LH** (*luteinizing hormone*) – hormon luteinizujący, **FSH** (*follicle stimulating hormone*) – folistimulina, **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik nekrotyzujący nowotworów, Fas-receptor błonowy z nadrodziny TNF, **FasL** (*Fas-ligand*) – ligand Fas, **FADD** (*Fas associated death domain*) – domena śmierci związana z fragmentem Fas, **CAD** (*caspase activated DNase*) – DNA-za aktywowana przez kaspazę, **ICAD** (*inhibitor caspase activated DNase*) – inhibitor DNA-zy aktywowanej przez kaspazę, **CDK p21** (*cdk inhibitory protein*) – białka hamujące z grupy CDK, **APAF** (*apoptosis protease activating factor*) –

czynnik aktywujący białka apoptotyczne, **DISC** (*death induced signalling complex*) – kompleks indukujący śmierć komórki, **PTK** (*protein tyrosine kinase*) – białkowa kinaza tyrozynowa, **PTP** (*protein tyrosine phosphatase*) – białkowa fosfataza tyrozynowa, **AIF** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik aktywujący apoptozę, **Bcl-2** (*B-cell lymphomas*) – białko antyapoptotyczne.

WSTĘP

Jajnik kobiety w wieku rozrodczym jest hormonalnie czynnym gruczołem, w którym proces apoptozy jest bardzo nasilony i dotyczy głównie komórek ziarnistych i komórek osłonki. Apoptoza limituje ilość i rozwój pęcherzyków jajnikowych oraz regresję ciała żółtego. Jest naturalnym procesem fizjologicznym zapewniającym homeostazę narządu oraz zabezpieczającym komórki przed ich nieprawidłowym funkcjonowaniem [1, 4, 5, 8]. Proces ten eliminuje też możliwość rozwoju ciąży mnogiej z kilkunastoma zarodkami [3, 5].

Apoptoza, czyli zaprogramowana „śmierć komórki”, towarzyszy jajnikowi ludzkiemu od urodzenia aż do późnej starości. O ile proces ten jest dobrze poznany u kobiet w okresie rozrodczym, o tyle na jego temat w okresie około- i pomenopauzalnym doniesień jest niewiele i zjawisko to wymaga dalszych badań [2, 4, 5, 18, 50]. Pierwsze sygnały starzenia się jajnika (określanego mianem perimenopauzy) rozpoczynają się od zaburzeń czynności aparatu pęcherzykowego. Klinicznie objawia się to obniżoną płodnością, zwiększonym odsetkiem poronień oraz wzrostem aberracji chromosomowych. Kobiety w okresie perimenopauzy mają mniejszą całkowitą liczbę komórek ziarnistych w przeliczeniu na jeden pęcherzyk, obniżone wytwarzanie hormonów steroidowych, głównie progesteronu oraz zmniejszone wytwarzanie inhibiny. Komórki ziarniste u tych kobiet są bardziej narażone na niedotlenienie [4, 5, 8, 46, 49]. W jajnikach kobiet po menopauzie, w których stwierdza się jedynie włóknistą tkankę łączną, naczynia krwionośne, chłonne i nerwy, komórki wykazują pewną aktywność apoptotyczną, jednak mniejszą niż komórki aparatu pęcherzykowego.

Regulacja procesu apoptozy jest procesem skomplikowanym i nie do końca poznany. Dotychczas wiadomo, że aktywację genów „śmierci komórki” można wywołać poprzez czynniki zewnątrz- (promieniowanie UW, promieniowanie γ) i wewnątrzkomórkowe (hormony, czynniki wzrostu i ich receptory, cytokiny, jony) [38, 39, 40]. W jajniku ludzkim rozwój komórek germinalnych zależy głównie od czynników wzrostu: IGF-1, EGF, TGF- α , bFGF, a wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych od hormonów gonadotropowych, takich jak: LH i FSH [17, 21, 24, 26, 34, 37, 41, 49]. Jednak nadal trwają liczne badania dotyczące dokładnej kontroli apoptozy w wybranych sytuacjach klinicznych. Celem badań jest optymalizacja leczenia chorób nowotworowych, immunologicznych (AIDS, reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń układowy) oraz degeneracyjnych (np. choroba Alzheimera) [7, 13, 14]. W ginekologii dokładne poznanie czynników indukujących i hamujących apoptozę w jajniku pozwoli wydłużyć funkcjonowanie gonad w aspekcie fizjologicznej steroidogenezy, a także wpłynąć na skuteczność chemioterapii nowotworów tych narządów [1, 3, 4, 5, 13, 14, 18].

CZYNNIKI REGULUJĄCE APOPTOZĘ. ETAPY APOPTOZY

Istotą zmian apoptotycznych w komórce jest obkurczenie komórki, kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA. Aktywacja apoptozy jest uporządkowanym procesem regulowanym przez szereg sygnałów pochodzących z wnętrza komórki lub z otaczającego ją środowiska. W związku z tym w pewnym uproszczeniu należy wyróżnić dwa główne szlaki indukcji apoptozy: pierwszy, zwany zewnątrzpochodnym, związany z błonowymi receptorami śmierci i drugi – wewnątrzpochodny zachodzący z udziałem mitochondriów [24, 32, 48].

Szlak zewnątrzpochodny może prowadzić do samobójczej śmierci komórki lub może być efektem przekazania sygnału przez komórki sąsiednie zawierające receptory śmierci, czyli TNF, Fas. Skierowanie komórki na drogę apoptozy rozpoczyna się od aktywacji białkowego receptora błonowego TNF lub Fas, który łączy się ze specyficznym ligandem i tworzy kompleks FasL lub DISC, czyli podbłonowy kompleks powstający po aktywacji i oligomeryzacji receptorów błonowych z nadrodziny TNF [32, 48].

Monomery Fas lub TNF tworzą agregaty, przyciągają białko cytozolowe FADD i dochodzi do aktywacji kaspazy 8. Jeśli sygnał ten nie zostanie zneutralizowany przez białka Bcl-2, to następuje zmiana w błonach mitochondrialnych i dochodzi do uwolnienia cytochromu c. Etap ten prowadzi do aktywacji kolejnych kaspaz, co przy braku hamowania doprowadzi w efekcie do degradacji DNA [23, 32, 48].

Aktywacja szlaku wewnątrzpochodnego następuje w wyniku oddziaływania na komórkę czynników uszkodzających, takich jak: niedotlenienie, obecność wolnych rodników, promieniowanie ultrafioletowe, brak czynników wzrostu itp. Czynniki uszkodzające DNA powoduje aktywację swoistych kinaz prowadzących do fosforylacji białka p-53. Białko to powoduje indukcję inhibitora CDK p21, co wywołuje blok w cyklu komórkowym. W przypadku, gdy uszkodzenie DNA jest niewielkie, zostaje ono naprawione, a białko p-53 ulega defosforylacji i degradacji. Rozpad białka p-53 umożliwia kontynuowanie cyklu komórkowego. Gdy jednak uszkodzenie DNA jest duże, dochodzi do indukcji ekspresji białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2. Białka te powodują uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium cytochromu c i białka AIF. Białko AIF ma aktywność proteazy i bezpośrednio może aktywować kaspazy. Z kolei cytochrom c po przedostaniu się do cytoplazmy łączy się z białkiem APAF zawierającym domenę rekrutującą kaspazy. Ostatecznie dochodzi do powstania kompleksu zwanego apoptosomem zawierającego cytochrom c, APAF, prokaspazę 9 i ATP. Apoptosom może rekrutować kaspazę 9 i doprowadzać do kaskadowej aktywacji kolejnych kaspaz [23, 32, 48]. W pewnych sytuacjach drogi te mogą zachodzić na siebie i możemy mieć do czynienia ze wzmocnieniem sygnału proapoptotycznego.

Morfologicznie apoptoza trwa od kilku minut do kilku godzin i składa się z trzech zróżnicowanych następujących kolejno po sobie faz zwanych fazą wzbudzenia, wykonawczą i zniszczenia. W I fazie mamy do czynienia z kondensacją chromatyny jądrowej, rozpadem jąder, zmniejszeniem objętości jądra i zagęszczeniem cytoplazmy. Następnie w fazie II dochodzi do fragmentacji jądra, a na powierzchni błony komórkowej

tworzą się ciała apoptotyczne, które zawierają organelle i fragmenty jądra. W końcowej fazie III dochodzi do degradacji resztek jądra i struktur cytoplazmatycznych. Fragmentacja chromatyny następuje pod wpływem aktywacji endonukleaz, które tną DNA komórki apoptotycznej najpierw na większe, a potem na coraz mniejsze fragmenty prowadząc ostatecznie do rozpadu jądra [32, 48].

W końcowym efekcie komórki apoptotyczne zmniejszają swoją objętość poprzez usuwanie wody i jonów z retikulum endoplazmatycznego do przestrzeni międzykomórkowej, co w cytoplazmie komórki prowadzi do wzrostu aktywności enzymu katalizującego i powstania szeregu nowych wiązań pomiędzy różnymi białkami, takimi jak: aktyna, aneksyna II, winkulina, fibronektyna, co zdecydowanie zmienia funkcje komórki [52].

ENDONUKLEAZY I KASPAZY JAKO EGZEKUTORZY APOPTOZY

Faza egzekucji apoptozy w przeciwieństwie do fazy indukcji przebiega podobnie w większości komórek. W procesie tym biorą udział głównie kaspazy, endonukleazy, kinazy i szereg innych czynników.

Kaspazy są to proteazy cysteinowe, hydrolizujące wiązania peptydowe w kilku rodzajach sekwencji aminokwasów. Występują w cytoplazmie komórek jako nieaktywne proenzymy w postaci pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Aktywacja kaspaz może następować w wyniku proteolizy innych kaspaz, co dodatkowo ułatwia realizację apoptozy. Do chwili obecnej zidentyfikowano około 14 typów kaspaz [7, 18, 22, 27, 32, 48]. Są one oznaczane kolejnymi liczbami. Aktywacja kaspaz następuje w mechanizmie autoproteolizy w dwóch różnych kompleksach białkowych: w kompleksie DISC albo w apoptosomie. W wyniku przekształceń w kompleksie DISC dochodzi do autoproteolizy kaspazy 8 i prawdopodobnie 10 i 12. Natomiast aktywacja apoptosomu prowadzi do aktywacji kaspazy 9, 7 i 3. Jak wspomniano wyżej, w programie apoptozy sugerowane jest często współdziałanie omówionych szlaków [7, 18, 22, 48].

Endonukleazy są także enzymami uczestniczącymi w realizacji procesu apoptozy. Od 1998 roku znana jest CAD, czyli DNA-za specyficzna dla procesu apoptozy aktywowana przez kaspazę 3 i 7. W prawidłowych komórkach, które nie ulegają apoptozie, CAD występuje jako nieaktywny kompleks połączony z białkiem inhibitorym – ICAD [7, 48]. Degradacja ICAD i uruchomienie procesu degradacji DNA następuje dopiero po aktywacji kaspazy 3 i 7, które mogą ulegać stymulacji poprzez różne czynniki (chemioterapeutyki, promieniowanie γ , UV) [18]. Ponadto postuluje się istnienie związku bezpośredniego pomiędzy aktywacją endonukleaz a wspomnianym wyżej czynnikiem indukującym apoptozę – AIF, który powoduje kondensację chromatyny i rozkład DNA na duże fragmenty. Działanie AIF może stanowić etap poprzedzający i ułatwiający działanie specyficznych endonukleaz [18, 32, 48].

Kolejne istotne enzymy biorące udział w realizacji apoptozy to kinazy. Kinazy tyrozynowe PTK mogą tworzyć integralną część receptorów błonowych czynników

wzrostu, takich jak: EGF i FGF. Enzymy te ulegają aktywacji po połączeniu ligandu z receptorem. Nie wiadomo jednak, jaki jest punkt uchwytu kinaz. Czy powodują one jedynie katalizowanie rozpoczętego wcześniej procesu apoptozy, czy też zmiana ufosforylowania białek rozpoczyna ekspresję genów programujących apoptozę [6, 7, 25, 44].

Największą i najbardziej poznaną grupę białek anti- i proapoptotycznych stanowią białka z rodziny Bcl-2/Bax [7, 13, 18, 23]. Białko Bcl-2 podnosi oporność komórek nowotworowych na czynniki wywołujące apoptozę, a białko Bax jest głównym efektem, poprzez które białko supresorowe p-53 indukuje apoptozę. Brak białka Bax może być przyczyną nieskuteczności chemioterapii zależnej od p-53.

Białka z rodziny Bcl-2 występują w postaci homo- lub heterodimerów. Podczas indukcji apoptozy przemieszczają się do zewnętrznej błony mitochondrialnej i tworzą kanały jonowe. Poprzez regulację przepuszczalności wody i jonów z mitochondrium mogą uwalniać kolejne białka proapoptotyczne [13, 23].

Proces apoptozy regulowany jest także przez szereg genów supresorowych i onkogenów. Różne białka, które są produktami działania genów, takie jak: białko p-53, p-Rb, c-myc, indukują lub hamują proces apoptozy w zależności od typu komórek i czynnika indukującego [6, 7, 14, 32]. Białka te są czynnikami transkrypcyjnymi oddziałującymi ze specyficznymi sekwencjami DNA, ich delecja lub inaktywacja jest wykazywana w ponad połowie nowotworów [6, 7, 18, 32, 48].

BUDOWA JAJNIKA LUDZKIEGO I DOJRZEWANIE PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH

Jajnik jest parzystym narządem położonym wewnątrztrzewnowo. Zbudowany jest z kory zawierającej pęcherzyki w różnym stopniu rozwoju (pierwotne, wzrastające, dojrzewające i dojrzałe), w których rozwijają się komórki jajowe oraz rdzenia zbudowanego z wiotkiej tkanki łącznej zawierającej włókna sprężyste i pojedyncze miocyty oraz naczynia krwionośne, chłonne i nerwy. W jajniku obecne są także komórki wnękowe przypominające komórki śródmiąższowe jądra oraz węzły tkanki przypominającej nadnercza, czyli reszty Marchanda [43].

Po menopauzie jajnik ulega znacznemu zmniejszeniu, nie zawiera pęcherzyków, a strukturę jego stanowi głównie włóknista tkanka łączna, naczynia krwionośne, limfatyczne i nerwy. U kobiet badanych w okresie do 5 lat po menopauzie stwierdza się ciała białawe zbudowane z fibroblastów, makrofagów i miofibroblastów [43].

Rozwój, wzrost, dojrzewanie i pęknięcie pęcherzyków jajnikowych oraz powstanie ciała żółtego i jego prawidłowe funkcjonowanie są procesami skomplikowanymi, w których biorą udział między innymi czynniki endokrynne (FSH, LH, estradiol, progesteron), parakrynne i autokrynne (IGF-1, IGF-2, EGF, TGF, FGF), protoonkogeny i geny supresorowe [5, 6, 7, 10, 34, 37]. Oprócz udowodnionego wpływu szeregu czynników ostatnio sugerowany jest także udział w tym procesie składników macierzy zewnątrzkomórkowej: tenascyny i fibronektyny [52]. W prawidłowym cyklu jajnikowym

spośród pęcherzyków pierwotnych powstają pęcherzyki dojrzewające, które między 1 a 4 dniem cyklu ulegają rekrutacji, a następnie między 5 a 7 dniem cyklu selekcji. Ostatecznie z kilku zrekrutowanych pęcherzyków jajnikowych dojrzewa jeden najczęściej pęcherzyk dominujący, pozostałe ulegają atrezji. Po owulacji powstaje ciało żółte, najbardziej aktywny hormonalnie gruczoł dokrewny organizmu kobiety. Jeśli w danym cyklu nie dojdzie do zapłodnienia komórki jajowej, ciało żółte ulega regresji, zwyrodnieniu tłuszczowemu i powstaje bogata w kolagen blizna, czyli ciało białawe [43, 49].

FUNKCJA HORMONALNA JAJNIKA

W okresie rozrodczym w komórkach tekalnych jajnika są syntetyzowane androgeny, które przechodzą do komórek ziarnistych i tam ulegają aromatyzacji do estrogenów. Czynność komórek tekalnych regulowana jest przez LH, zaś aktywność aromatazy P-450 komórek ziarnistych zależna jest od FSH. Podstawowym hormonem produkowanym przez ciało żółte jest progesteron [43]. Menopauza nie oznacza całkowitego wygaśnięcia funkcji hormonalnych jajnika. Atrezja pęcherzyków jajnikowych oznacza zakończenie cyklicznej czynności jajników i tym samym zdolności rozrodczych, ale nie jest równoznaczna z tym, że jajnik zostaje zastąpiony nieczynną hormonalnie tkanką łączną. Utrzymana zostaje, w zmniejszonym stopniu funkcja komórek osłonki i nadal produkowane są pewne ilości steroidów, głównie androgenów. Dowodzą tego liczne badania przeprowadzone u kobiet po menopauzie, które wykazały w jajniku aktywność aromatazy P-450 oraz dehydrogenazy 3- β - i 17- β -steroidowej. Także doniesienia mówiące o obecności receptorów błonowych dla FSH i LH oraz receptorów cytoplazmatycznych dla estrogenów, androgenów i progesteronu świadczyć mogą o aktywności hormonalnej tkanki jajnikowej w tym okresie [43].

APOPTOZA W PĘCHERZYKACH JAJNIKOWYCH

Opisane powyżej znaczne obkurczanie się komórki w procesie apoptozy (nawet o 30–50% objętości) powoduje utratę kontaktu z komórkami sąsiednimi. W pęcherzyku Graffa po utracie połączeń komórki jajowej z komórkami ziarnistymi dochodzi do zapadnięcia jamy pęcherzykowej i pofałdowania oraz obkurczenia osłonki przejrzystej. Błona podstawna pęcherzyka ulega pofałdowaniu, pogrubieniu i przekształcona zostaje w błonę szklaną. Pęcherzyk atrezyjny zostaje przekształcony w bliznę [10, 15, 17, 19, 20].

Wiadomo, że noworodek płci żeńskiej w chwili narodzin posiada około 2 milionów oocytów, z czego w okresie pokwitania pozostaje około 400 tysięcy, a owuluje mniej niż 500 [43, 49]. Udowodniono, że to apoptoza prowadzi do atrezji pęcherzyków jajnikowych przed osiągnięciem przez nie zdolności do owulacji. W wyniku apoptozy dochodzi do procesów degeneracyjnych w pęcherzykach już uformowanych oraz zaniku komórek terminalnych [11, 19, 20, 31]. Już w 1978 roku wykazano obecność jąder pyknotycznych w komórkach ziarnistych oraz w komórkach osłonki pęcherzyka w jajniku ludzkim. W 1989 roku stwierdzono w jajniku aktywność kluczowych enzymów apoptozy, czyli

endonukleaz zależnych od Ca i Mg, a w 1992 roku potwierdzono fragmentację jądrowego DNA jajnika ludzkiego świadcząca o zakończonym procesie apoptozy [17, 47]. W wieku rozrodczym w pęcherzyku Graffa w wyniku apoptozy dochodzi do szeregu zmian czynnościowych: zmniejszenia ekspresji receptorów dla gonadotropin, obniżenia aktywności 17- α -hydroksylazy i 17, 20-liazy. Zmiany te doprowadzają do zmniejszenia produkcji estradiolu oraz zmniejszenia stężenia IGF-1 czynnika stymulującego proliferację komórek ziarnistych [3, 11, 17, 31].

W badaniach przeprowadzonych w jajniku wykazano obecność błonowego mRNA dla receptora Fas w komórkach ziarnistych. Metodami immunohistochemicznymi wykazano ekspresję Fas w komórkach pęcherzyków wykazujących cechy atrezji. Nie stwierdzono natomiast obecności tej glikoproteiny w komórkach prawidłowych. Obecność liganda dla Fas opisano w oocytach prawidłowych i atrezyjnych [9, 17, 29].

W innych badaniach wykazano, że system Fas/FasL jest skutecznie hamowany przez tlenek azotu i tym samym NO może okazać się istotnym czynnikiem ograniczającym atrezię pęcherzyków jajnikowych [9, 10]. Najważniejsze czynniki regulujące apoptozę w komórkach ziarnistych jajnika to gonadotropiny, gonadoliberyna, estrogeny, androgeny, IGF-1 i jego białka wiążące, bFGF, EGF, TGF- α , TNF- α [18], a także według najnowszych doniesień tromboproteiny [42], metaloproteiny i inhibina A [12, 15].

Badając znaczenie kinaz w apoptozie komórek ziarnistych doniesiono, że aktywna mitogennie kinaza białkowa PTK aktywuje apoptozę komórek ziarnistych poprzez stymulację białkowej fosfatazy tyrozynowej PTP. PTP oraz PTK grają główną rolę w mechanizmie wzrostu i metabolizmu komórek ziarnistych [7, 25, 29, 44].

W badaniach nad wpływem hormonów na apoptozę jajnikową udowodniono, że przeciwciała skierowane przeciwko gonadotropinom przysadkowym powodują atrezię pęcherzyków przedowulacyjnych, a zatem gonadotropiny FSH i LH chronią oocyt przed apoptozą. W innych badaniach przeprowadzonych na szczurach stwierdzono obniżone stężenia mRNA dla receptorów gonadotropin FSH i LH w pęcherzykach atrezyjnych. Gonadoliberyna (GnRh) działając bezpośrednio na jajnik jest czynnikiem wywołującym atrezię pęcherzyków [18, 28, 35]. Wykazano, że podanie GnRH obniża masę jajnika, zmniejsza liczbę komórek antralnych i przedowulacyjnych oraz zwiększa stężenia wapnia w komórkach ziarnistych, co aktywuje endonukleazy degradujące DNA [18, 26, 28, 35]. Na podstawie doświadczeń wykonanych u szczurów pozbawionych przysadki mózgowej udowodniono, że nasilenie apoptozy w wzrastających i dojrzewających komórkach ziarnistych było tym większe, im większe były dawki substytucyjne agonistów GnRh i dietynostylbestrolu. Oceniając wpływ androgenów i estrogenów na apoptozę wykazano, że w płynie pęcherzyków atrezyjnych stężenia androgenów są większe niż w pęcherzykach prawidłowych. Podając substytucyjnie androgeny i estrogeny szczurom pozbawionym przysadki udowodniono, że androgeny przyspieszają, a estrogeny hamują apoptozę jajnikową w komórkach ziarnistych pęcherzyków preantralnych i antralnych. W tych samych badaniach wykazano, że również IGF-1, EGF, TGF- α w hodowli *in vitro* komórek ziarnistych pęcherzyków przedowulacyjnych hamują apoptozę [16, 17, 24, 28, 29, 35].

Inhibina A jest białkowym hormonem jajnikowym, produkowanym przez komórki ziarniste, komórki tekalne i ciało żółte. Inhibina A skutecznie hamuje kaspazę 3 i białka

Bax, co owocuje zablokowaniem apoptozy przede wszystkim w komórkach ziarnistych [11, 45]. Wykazano ponadto istotną korelację pomiędzy stężeniem IGF o niskiej masie cząsteczkowej w płynie pęcherzykowym pacjentek stymulowanych w programach zapłodnienia pozaustrojowego a aktywnością kaspazy 3 i jakością oocytów [11, 33]. Badanie to jako metoda nieinwazyjna może posłużyć w przyszłości do testu przesiewowego jakości oocytów i prognozowaniu skuteczności procedur IVF/ET [33, 45, 51].

Ciałko żółte, jak już wspomniano, także ulega procesom apoptozy, które prowadzą do luteolizy i całkowitego jego zaniku. Wykazano jednak, że gonadotropina kosmówkowa ma zdolność hamowania apoptozy i utrzymywania funkcji tego gruczołu. Taka sytuacja występuje w ciąży [30, 45, 51]. W ostatnim czasie wykazano także, że trofoblast produkuje jeszcze inny czynnik lub czynniki, dokładnie nieokreślone, które działają poprzez białka bax/bcl-x, hamują apoptozę i wydłużają funkcję ciała żółtego [13, 30, 51]. Ponadto udowodniono, że za prawidłową angiogenezę i wydolność ciała żółtego w ciąży odpowiada VEGF i receptor VEGF typu 2. Podanie przeciwciał przeciw VEGF ciężarnym samicom spowodowało nasilenie procesów apoptozy w ciałku żółtym, zmniejszenie stężenia progesteronu, zmniejszenie rozmiarów zarodka [36, 45].

Działając poprzez kinazę białkową typu A procesy apoptozy w jajniku regulowane są także przez tromboproteiny. Powodują one zmniejszenie produkcji androstendionu, estradiolu, TGF-2 beta, natomiast wzrost produkcji oksytocyny, inhibin A i B oraz IGF-1 [42].

PODSUMOWANIE

Przedstawione w artykule informacje wskazują, że mechanizmy apoptozy w jajniku są bardzo skomplikowane i nie do końca poznane. Trwające aktualnie badania dotyczą przede wszystkim regulacji apoptozy i możliwości sterowania tym procesem w jajniku w zaburzeniach endokrynologicznych i w chorobach nowotworowych. Niewątpliwie konieczne są dalsze badania apoptozy w jajniku ludzkim, zwłaszcza w okresie menopauzy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARDEN N, BETENBAUGH MJ. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol* 2004; **22**: 174–180.
- [2] ARRAZTOA JA, ZHOU J, MARCU D, CHENG C, BONNER R, CHEN M, XIANG C, BROWNSTEIN M, MAISEY K, IMARAI M, BONDY C. Identification of genes expressed in primate primordial oocytes. *Hum Reprod* 2005; **20**: 476–483.
- [3] AMSTERDAM A, DANTES A, HOSKAWA K, SCHERE-LEVY CP, KOTSUJI F. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids* 1998; **63**: 314–318.
- [4] AMSTERDAM A, SASSON R, KEREN-TAL I, AHARONI D, DANTES A, RIMON E, LAND A, COHEN T, DOR Y, HIRSH L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochem Pharmacol* 2003; **15**: 1355–1362.
- [5] AMSTERDAM A, KEREN-TAL I, AHARONI D, DANTES A, LANG-BRACHA A, RIMON E, SASSON R, HIRSH L. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids* 2003; **68**: 861–867.

- [6] BAUM JS, ST GEORGE JP, McCALL K. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 245–259.
- [7] BIELAK-ŻMIJEWSKA A, KORONKIEWICZ M, SKIERSKI J., PIWOCKA K, RADZISZEWSKA E, SIKORA E. Effect of curcumin on the apoptosis of rodent and human nonproliferating and proliferating lymphoid cells. *Nutr Cancer* 2000; **38**: 131–138.
- [8] BUFET NC, BOUCHARD P. The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chronobiol Int* 2001; **18**: 893–919.
- [9] CHEN Q, YANO T, MATSUMI H, OSUGA Y, YANO N, XU J, WADA O, KOGA K, FUJIWARA T, KUGU K, TAKETANI Y. Cross-talk between Fas/Fas ligano system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis; a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. *Endocrinol* 2005; **146**: 808–815.
- [10] CHUN SY, HSUEH AJ. Paracrine mechanism of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol* 1998; **38**: 63–75.
- [11] DEKOVA R, BOURNEVA V, STANEVA-DOBROVSKI L, ZVETKOVA E, BALEVA K, YANEVA E, NI-KOLOV B, IVANOV I, SIMEONOV K, TIMEVA T, YANKOV M. *In vitro* effects on apoptosis and apoptosis related proteins in human ovarian granulosa cells. *Endocr Regul* 2004; **38**: 51–55.
- [12] DHARMARAJAN AM, GOODMAN SB, ATIYA N, PARKINSON SP, LAREU RR, TILLY KI, TILLY JL. Role of apoptosis in functional luteolysis in the pregnant rabbit *corpus luteum*; evidence of a role for placental-derived factors in promoting luteal cell. *Apoptosis* 2004; **9**: 807–814.
- [13] DOBRYSZYCKA W. Patofizjologia programowanej śmierci komórki. *Post Med Dośw* 1998; **52**: 423–444.
- [14] DOBRYSZYCKA W. Rola programowej śmierci komórki w raku jajnika – aspekty kliniczne. *Adv Clin Exp Med* 2000; **9**: 217–228.
- [15] FATA JE, HO AT, LECO KJ, MOOREHEAD RA, KHOKHA R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 77–95.
- [16] GOSPEN R, SPEARS N. Programmed cell death in the reproductive system. *Br Med Bull* 1997; **53**: 644–661.
- [17] GROTOWSKI W, LECYBYŁ R, WARENİK-SZYMANEKIEWICZ A, TRZECIAK W. Rola apoptozy komórek ziarnistych w procesie atrezji pęcherzyków jajnikowych. *Gin Pol* 1997; **68**: 317–326.
- [18] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **15**: 9–43.
- [19] HUSSEIN M R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Updat* 2005; **11**: 162–178.
- [20] KAMO A, ARAKI Y, MAEDA K, WATANABLE H. Characteristics of invasive cells found in between *zona pellucida* and oocyte during follicular atresia in mice. *Zygote* 2004; **12**: 269–276.
- [21] KHAN S.M., OLIVER R.H, YEH J. Epidermal growth factor receptor inhibition by tyrphostin 51 induces apoptosis in luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 469–473.
- [22] KILIAŃSKA-ŻMIJEWSKA ZM, MICKIEWICZ A. Kaspazy kręgowców, ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 129–152.
- [23] KIM MR, TILLY JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1644**: 205–210.
- [24] KRYSKO DV, MUSSCHE S, LEYBAERT L, D'HERDE K. Gap junctional communication and connexin 43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *Histochem Cytochem* 2004; **52**: 1199–1207.
- [25] LACHOWICZ A, RĘBAS E, ŻYLIŃSKA L, LACHOWICZ L. Różnorodne aspekty działania kinaz białkowych w apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 111–124.
- [26] LEUNG PC, CHENG CK, ZHU XM. Multifactorial role of GnRh-I and GnRh-II in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **202**: 145–153.
- [27] ŁAZARCZYK M, GRZELA T. Rodzina peptydów zwanych domeną koniczyno-podobną. *Post Biol Kom* 2000; **1**: 125–136.
- [28] MANABE N, GOTO Y, MATSUDA-MINEHATA F, INOUE N, MAEDA A, SAKAMAKI K, MIYANO T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev* 2004; **50**: 493–514.
- [29] MARKSTROM E, SVENSSON ECH, SHAO R, SVANBERG B, BILING H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; **123**: 23–30.
- [30] MARTI A, JAGGI R, VALLAN C, RITTER PM, BALTZER A, SRINIVASAN AM, FRIIS RR. Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1190–1200.
- [31] MORITA Y, TILLY JL. Sphingolipid regulation of female gonadal cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2000; **905**: 209–220.
- [32] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **3**: 315–334.

- [33] NICHOLAS B, ALBERIO R, FOULADI-NASHTA AA, WEBB R. Relationship between low molecular weight insulin-like growth factor binding proteins, caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biol Reprod* 2004; **24**: 145–160.
- [34] QUINTANA R, KOPCOW L, SUELDO C, MARCONI G, RUEDA NG, BARANAO RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril* 2004; **82**: 1101–1105.
- [35] PARBORELL F, IRUSTA G, VITALE A, GONZALES O, PECCI A, TESONE M. Gonadotropin-releasing hormone antagonist antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Reprod* 2005; **72**: 659–666.
- [36] PAULI SA, TANG H, WANG J, BOHLEN P, POSSER R, HARTMAN T, SAUER MV, KITAJEWSKI J, ZIMMERMANN RC. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in *corpora lutea* of pregnancy in the rodent. *Endocrinology* 2005; **146**: 1301–1311.
- [37] PELUSO JJ. Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATP-ase (PCMA) as part of an anti-apoptotic mechanism of action. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 363–369.
- [38] PRU JK, TILLY JL. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Mol Endocrinol* 2001; **15**: 845–853.
- [39] PUSHKALA K, GUPTA PD. Steroid hormones regulate programmed cell death: a review. *Cytobios* 2001; **106**: 201–217.
- [40] ROLAKI A, DRAKAKIS P, MILLINGOS S, LOUTRADIS D, MAKRIGINNAKIS A. Novel trends in follicular development, atresia and *corpus luteum* regression: role for apoptosis. *Reprod Biomed Online* 2005; **11**: 93–103.
- [41] SAITO T, OKADA S, OHSHIMA K, SATO M, UEHARA Y, SHIMIZU H, PESSIN J E, MORI M. Differential activation of epidermal growth factor (EGF) receptor downstream signaling pathways by betacellulin and EGF. *Endocrinol* 2004; **145**: 4232–4243.
- [42] SIROTKIN A V, SANISLO P, SCHAEFFER HJ, FLORKOVICOVA I, KOTWICA J, BULLA J, HETENYI L. Thromboprotein regulates proliferation, apoptosis, secretory activity and intracellular messengers in porcine ovarian follicular cells: involvement of protein kinase A. *J Endocrinol* 2004; **183**: 595–604.
- [43] SKAŁBA P. Endokrynologia ginekologiczna. 1993: 22–24.
- [44] TAMURA M, NAKAGAWA Y, SHIMIZU H, YAMADA N, MIYANO T, MIYAZAKI H. Cellular function of mitogen-activated protein kinases and protein tyrosine phosphatases in ovarian granulosa cells. *J Reprod Dev* 2004; **1**: 47–55.
- [45] TILLY JL. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicol Lett* 1998; **102–103**: 497–501.
- [46] TILLY JL. Oocyte apoptosis: prevention strategies, and implications for female aging and the menopause. *Ann Endocrinol* 2003; **64**: 82–84.
- [47] WEI P. Fas, FasL, Bcl-2, and Bax in the endometrium of rhesus monkey during the menstrual cycle. *Mol Reprod Dev* 2005; **70**: 478–484.
- [48] WIDŁAK P. Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 111–124.
- [49] VASKIVUO TE, TAPANAINEN JS. Apoptosis in the human ovary. *Reprod Biomed Online* 2003; **6**: 24–35.
- [50] VITAL REYES VS, TELLEZ VELASCO S, HINOJOSA CRUZ JC, REYERS FUENTES A. Ovarian apoptosis. *Ginecol Obstet Mex* 2001; **69**: 101–107.
- [51] XAVIER PA. Apoptosis and human reproduction. *Acta Med Port* 2002; **15**: 287–291.
- [52] YASUDA K, HAGIWARA E, TAKEUCHI A, MUKAI C, MATSUI C, SAKAI A, TAMOTSU S. Changes in the distribution of tenascin and fibronectin in the mouse ovary during folliculogenesis, atresia, *corpus luteum* formation and luteolysis. *Zoolog Sci* 2005; **22**: 237–245.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 09.06.2005 r.

Przyjęto: 25.11.2005 r.

ul. Unii Lubelskiej 1, 72-252 Szczecin

e-mail: agabrod@wp.pl

MIKRO-RNA – MAŁE CZĄSTECZKI O WIELKIM ZNACZENIU

MICRO-RNAs – SMALL MOLECULES OF BIG IMPORTANCE

Agata FILIP

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego
w Lublinie

Streszczenie: MikroRNA (miRNA) to grupa jednoniciowych, niekodujących RNA, które regulują ekspresję genów strukturalnych na poziomie posttranskrypcyjnym. Pierwotny transkrypt mikroRNA ma kilkaset nukleotydów długości, natomiast aktywną formę dojrzałą stanowią krótkie fragmenty 21–23-nukleotydo-we. Wiąże się one z mRNA genu docelowego katalizując jego degradację, jeśli komplementarność sekwencji jest całkowita, lub zahamowanie procesu translacji w przypadku niepełnej komplementarności. Dotychczas opisano kilkaset genów kodujących miRNA w genomach roślinnych i zwierzęcych. Wiele ważnych procesów życiowych zależy od kontroli ekspresji genów poprzez miRNA. Niektóre z nich bezpośrednio regulują rozwój, inne wpływają na przebieg procesu śmierci programowanej, istnieją też miRNA niezbędne dla prawidłowej sygnalizacji komórkowej. Profil ekspresji miRNA charakteryzuje poszczególne typy nowotworów znacznie lepiej niż profil ekspresji mRNA, co może mieć znaczenie diagnostyczne i terapeutyczne. Praca przedstawia przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat dojrzewania miRNA, mechanizmów regulacji ekspresji genów za ich pośrednictwem oraz roli tych cząsteczek w embriogenezie, hematopojezie i onkogenezie.

Słowa kluczowe: miRNA, regulacja ekspresji genów, onkogeneza.

Summary: MicroRNAs (miRNAs) constitute a group of single-stranded, noncoding RNAs that regulate the expression of structural genes on post-transcriptional level. miRNAs are transcribed as several hundred-nucleotide pri-miRNAs. The mature, active form is only 21–23 nucleotides long and it binds target mRNAs containing antisense sequences. miRNA can either catalyze cleavage of mRNA that are perfectly base-paired to its sequence, or inhibit the translation of mRNAs that form an imperfect complex with the miRNA. Hundreds of miRNAs are described to date, which populate the genomes of plants and animals. They are necessary for crucial cellular and developmental processes. Some of them directly regulate the development; some affect programmed cell death (PCD), some at last are essential for signal transduction. miRNA expression profiles classify human cancers better than mRNA profiles what may be of big diagnostic and therapeutic value. This study presents the current understanding of miRNA biogenesis, regulatory mechanisms and the role that miRNAs exert in embryogenesis, hematopoiesis and oncogenesis.

Key words: miRNA, regulation of gene expression, oncogenesis.

WSTĘP

Mechanizm indukujący posttranskrypcyjne wyciszenie ekspresji genów w odpowiedzi na wprowadzenie egzogennych, dwuniciowych fragmentów RNA (dsRNA) o sekwencji identycznej jak mRNA genu docelowego opisano po raz pierwszy u nicienia *C. elegans* [5, 8, 11]. Wkrótce okazało się, że odpowiedzialny jest on za obserwowane już wcześniej zjawisko inaktywacji genów w komórkach niektórych grzybów i roślin. Obecność tego rodzaju regulacji potwierdzono także u *Drosophila melanogaster*. Pierwsze doświadczenia z interferencyjnym RNA u kręgowców nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Wprowadzenie długich fragmentów dsRNA aktywuje bowiem system odpornościowy do odpowiedzi nieswoistej, między innymi do produkcji interferonu (system ten nie występuje u bezkręgowców), co implikuje globalne posttranskrypcyjne zahamowanie ekspresji genów [8].

Badania mechanizmu interferencji w komórkach roślin i bezkręgowców pozwoliły stwierdzić, że długie fragmenty dsRNA są cięte na charakterystyczne 21-nukleotydowe odcinki z wystającymi (*overlapping*) 2-nukleotydowymi końcami 3'. Określono je jako dupleksy małych, interferujących RNA (*small interfering RNAs duplexes*, siRNAs). Jedna nić takiego dupleksu siRNA jest następnie włączana w duży kompleks białkowy, RISC (*RNA induced silencing complex*) [25]. Kompleks RISC/siRNA łączy się następnie z fragmentem sekwencji 3'-UTR (*3' untranslated region*) genu docelowego i w zależności od stopnia komplementarności może powodować degradację mRNA lub tylko zahamowanie translacji przy zachowaniu integralności transkryptu [20, 27, 34].

Dalsze badania nad siRNA u kręgowców umożliwiła obserwacja, że wprowadzenie dsRNA krótszych niż 30 bp nie indukuje wydzielania interferonu. Okazało się wówczas, że szlak regulacji ekspresji genów *via* mechanizm interferencji u ssaków może być w pełni aktywny.

Poszukiwanie endogennych dupleksów siRNA o długości 21 bp u *Drosophila* i *C. elegans* wykazało, że są one obecne w obu tych systemach, potem niespodziewanie istnienie ich opisano u kręgowców, gdzie kodowane są przez ponad 200 różnych genów [13, 20, 29]. Ta właśnie grupa endogennych RNA określana jest obecnie mianem miRNA (*microRNA*). miRNA są transkrybowane jako fragmenty o długości kilkuset nukleotydów, przejściowo podczas dojrzewania przyjmują strukturę „szpilki do włosów” (60–90 nt), by ostatecznie stać się aktywną formą o długości 21 nt, która, podobnie jak siRNA, może wejść w skład kompleksu RISC [10].

miRNA

Po raz pierwszy miRNA opisane zostały przez Ambrosa i Ruvkuna w 1993 r. [33, 35]. Badając stadia rozwoju *Caenorhabditis elegans* stwierdzili oni, że do prawidłowego przejścia ze stadium larwalnego L1 do L2 niezbędna jest krótka sekwencja RNA hamująca ekspresję genu strukturalnego *lin-14* [3, 8, 27, 33, 34]. Gen *lin-4* *C. elegans* koduje RNA o długości 21 nukleotydów, które rozpoznaje i wiąże sekwencje

komplementarne w regionie 3'UTR mRNA genu *lin-14*. W ten sposób dochodzi do zahamowania jego translacji podczas przejścia z pierwszego do drugiego stadium larwalnego, dzieje się to jednak bez degradacji mRNA [34, 35]. Kolejnym opisanym genem, kodującym miRNA był *let-7* zaangażowany także w regulację rozwoju nicienia. Wkrótce potem geny homologiczne do *let-7* znaleziono w genomach muszki owocowej i człowieka. Stało się jasne wówczas, iż miRNA stanowią konserwatywne filogenetycznie negatywne regulatory ekspresji genów. Ekspresja miRNA jest tkankowo lub nawet komórkowo-specyficzna, zależy również od stadium rozwoju [23, 25].

BIOGENEZA miRNA

Ilość poznanych genów kodujących miRNA stale rośnie. Przepuszczalnie jest ich kilkaset (200–1000 w zależności od gatunku), co stanowi ponad 1% genomu danego organizmu [16, 34]. Mogą mieć one różne lokalizacje: w intronach genów bądź w obszarach pozagenowych. Występują pojedynczo lub w policistronowych skupiskach (37% znanych ludzkich miRNA zlokalizowanych jest w skupiskach po dwa lub więcej). Jeśli znajdują się w intronie, przypuszczalnie wykorzystują promotor i elementy regulatorowe genu gospodarza. Natomiast regulacja genów miRNA zgrupowanych w formie policistronów jest najprawdopodobniej wspólna, analogicznie do operonów bakteryjnych [20].

Większość, jeśli nie wszystkie miRNA jest transkrybowana przez polimerazę II, transkrypt pierwotny ma czapkę (cap) i ogonek poli-A [13]. Dojrzewanie miRNA przebiega dwuetapowo, przy czym oba etapy katalizowane są przez enzymy z dużej rodziny rybonukleazy III: Drosha i Dicer.

Drosha

Transkrypt pierwotny miRNA, pri-miRNA (*primary miRNA*) składa się z kilkuset nukleotydów. Pierwszy, jądrowy etap dojrzewania polega na wycięciu z tego transkryptu fragmentu o długości około 70 nt, przyjmującego formę szpilki do włosów. Na końcu 3' struktura taka ma dwunukleotydowe „wysunięcie” (ryc. 1). Za przebieg tego etapu odpowiedzialny jest enzym Drosha [34].

Drosha są białkami jądrowymi o wielkości 130–160 kDa, zawierającymi dwie domeny katalityczne o aktywności RNazy III i domenę wiążącą dsRNA (dsRBD, *dsRNA Binding Domain*) w części C-końcowej [32]. Jak ostatnio wykazano, Drosha występują w kompleksie z białkiem dsRBD Pasha (u *Drosophila*) lub DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region Gene 8*) u ssaków. Kompleks ten nazywany jest mikroprocesorem [13, 25]. Sam enzym Drosha wykazuje niespecyficzną aktywność RNazy, o specyficie prawdopodobnie decyduje Pasha/DGCR8 [10]. Następnie pre-miRNA eksportowany jest do cytoplazmy przez białko Exportin-5 (Exp5). Exportin-5 należy do rodziny karioferynowych, jądrowo-cytoplazmatycznych czynników transportujących, zależnych od wiążącego GTP kofaktora Ran [8].

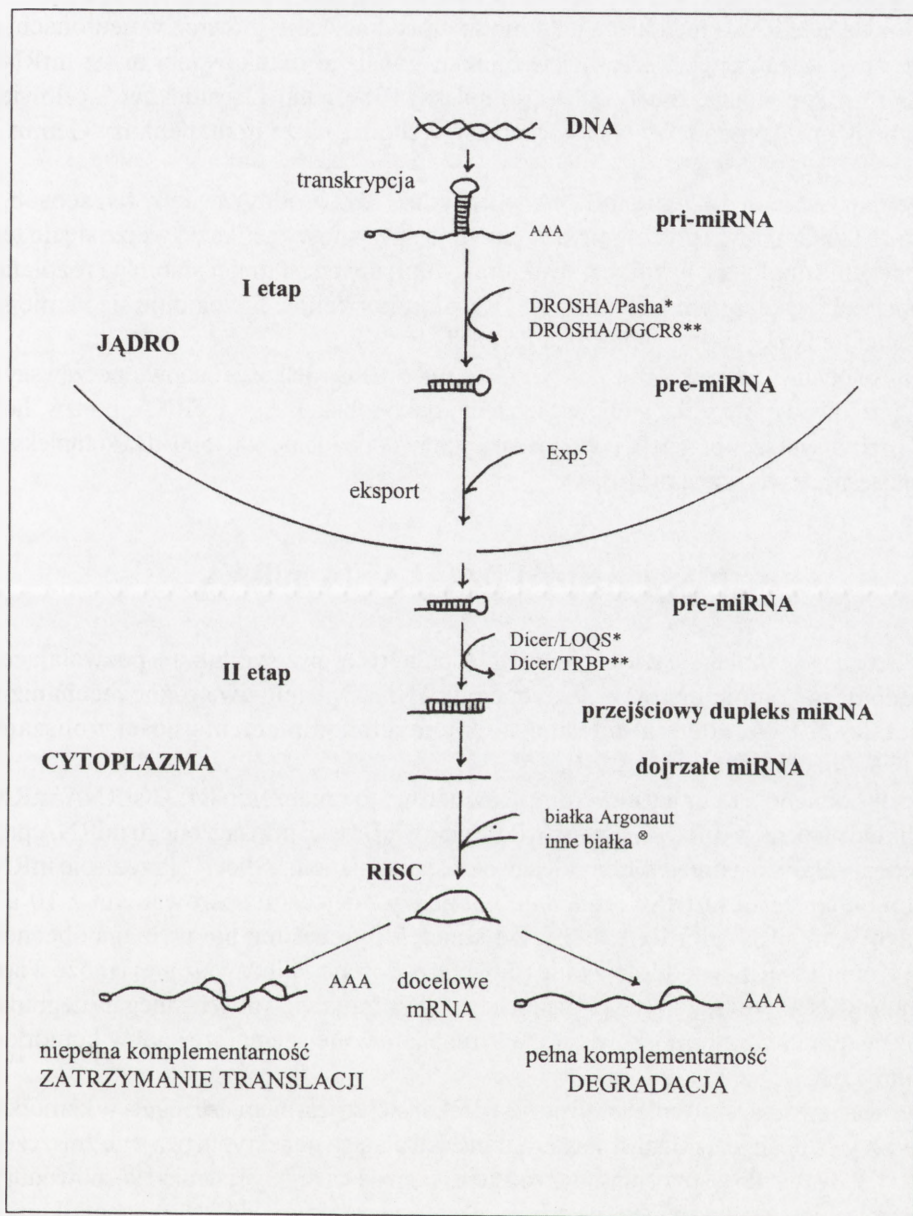
Dicer

W następnym etapie dojrzewania miRNA bierze udział rybonukleaza Dicer. Białka Dicer są duże, około 200 kDa; zawierają domeny o aktywności ATP-azy/helikazy RNA, domenę PAZ i DUF283, dwie domeny katalityczne o aktywności rybonukleazy (RIIIA i RIIB) i C-końcową domenę dsRBD [10]. U drożdży i kręgowców występują geny dla jednego rodzaju białka Dicer, natomiast u *Drosophila*, *Arabidopsis* i kilku innych organizmów opisano dwa lub nawet więcej genów, których produkty nieznacznie różnią się funkcją. Jest to enzym zależny od ATP, odznaczający się wysokim powinowactwem do dwuniciowych RNA (dsRNA) posiadających 2nt wysunięcie na końcu 3'. Za rozpoznanie tego fragmentu odpowiada domena PAZ. Po przyłączeniu RNA Dicer przecina oba łańcuchy w odległości ~21nt od miejsca wiązania (ryc. 1). Dzieje się tak w przypadku „obróbki” długich dsRNA (np. egzogennych), a także wówczas, gdy Dicer przyłączy się do pre-miRNA [20, 34]. Fakt, że Dicer przecina łańcuchy RNA w określonej odległości od zakończenia pre-miRNA, oznacza, iż struktura pre-miRNA determinuje sekwencję dupleksu miRNA::miRNA, powstałego w wyniku działania tego enzymu. Prawidłowe działanie nukleazy Dicer uwarunkowane jest prawdopodobnie połączeniem z białkiem Loquacious (LOQS) u *Drosophila* bądź jego ortologiem TRBP (HIV-1 *Transactivating Response RNA-binding Protein*) u ssaków [12, 14].

Dupleksy miRNA są nietrwałe i w związku z tym trudne do wykrycia, łańcuchy RNA bowiem dosyć szybko ulegają rozdzieleniu [8]. Z większości prekursorowych miRNA powstaje tylko jedna cząsteczka dojrzałego miRNA, a o wyborze określonego łańcucha decyduje stabilność par zasad na zakończeniach dupleksu. W przypadku niektórych pre-miRNA (np. miR-30) dojrzałe miRNA mogą powstać z obydwu nici dupleksu. Krótki okres półtrwania dupleksów miRNA wynika prawdopodobnie z faktu, iż dojrzałe cząsteczki miRNA dosyć szybko włączane są w kompleks RISC (inaczej miRNP - kompleks miRNA i białek). Budowa tego kompleksu nie jest jeszcze wyjaśniona do końca, wiadomo na pewno, że w jego skład wchodzi między innymi białka rodziny Argonaut [25].

Białka Argonaut

Białka Argonaut można podzielić na dwie podrodziny: Ago i Piwi. U człowieka i innych ssaków powszechnie występują 4 białka Ago (hAgo1-4), natomiast ekspresję 4 genów podrodziny Piwi opisano dotychczas jedynie w komórkach jąder i komórkach macierzystych układu hemopoetycznego; ich funkcja nie jest znana. Eukariotyczne białka Argonaut mają wielkość ~100 kDa i są silnie zasadowe. Mają one domenę PAZ (podobnie jak białka Dicer) i domenę Piwi, wspólną dla podrodzin Ago/Piwi [10]. Jak wcześniej wspomniano, domena PAZ odpowiada za specyficzne wiązanie dupleksów RNA z wystającymi, 2 nt końcami 3'. Natomiast domena Piwi, w której skład wchodzi trójka kwaśnych aminokwasów DDE typowych dla RNazy H (enzym przecinający nić RNA hybrydy DNA:RNA) i enzymów jej podobnych, stanowi być może o endonukleolitycznej aktywności kompleksu RISC.



RYCINA 1. Dojrzewanie i mechanizmy działania miRNA (za [8], modyfikacja): **Drosophila*, **ssaki, ⊗ – objaśnienia w tekście

Kompleks RISC

U *Drosophila* w skład kompleksu RISC zawsze wchodzi białko lub białka rodziny Argonaut, białko *VIG* (*Vasa Intronic Gene protein*, RBP), Tudor-SN (białko mające pięć domen SN o aktywności nukleazy i domenę Tudor) i dFXR, będące ortologiem ludzkiego białka FMRP (*fragile X mental retardation protein*) [10]. FMRP i FXR1 to

białka wiążące RNA, działające jako modulatory translacji, głównie w neuronach, co może mieć też związek z ich rolą w represji translacji indukowanej przez miRNA. Wydaje się, że podobnie zbudowane są kompleksy RISC u innych gatunków. U człowieka poza białkami Argonaut w skład kompleksu wchodzi także m.in. helikazy Gemin 3 i Gemin 4 [15, 20].

Wydaje się, że włączenie miRNA w kompleks RISC odbywa się w ten sposób, iż jeden ze składników tego kompleksu, enzym o aktywności helikazy, wiąże się do tego zakończenia dupleksu, w którym struktura dwuniciowa jest mniej stabilna i rozplata ją wykorzystując energię z ATP [10]. Nić RNA, której koniec 5' znajduje się w miejscu wiązania helikazy, zostaje włączona do RISC (ryc. 1).

Funkcjonalny kompleks RISC/siRNA może mieć różną wielkość i budowę, począwszy od 100–160 kDa w przypadku struktury złożonej tylko z białek Ago i siRNA, po tzw. holo-RISC, sedymentujący przy 80S, odpowiadający prawdopodobnie 300–500 kDa kompleksowi asocjującemu z rybosomami [10].

MECHANIZM DZIAŁANIA miRNA

Obecna w kompleksie RISC nić miRNA pełni rolę „przewodnika”, pozwalającego mu odnaleźć komplementarną sekwencję mRNA. Opisano dwa różne mechanizmy działania miRNA, zdeterminowane stopniem ich komplementarności z obszarem 3'-UTR docelowego mRNA [10, 15].

Jeśli sekwencje te są wysoce komplementarne, to połączenie RISC/siRNA/mRNA implikuje przecięcie mRNA naprzeciwko środkowej części przyłączonego miRNA przez niezidentyfikowaną dotąd rybonukleazę określaną mianem „Slicer”. Przecięcie mRNA w obrębie kompleksu RISC następuje pomiędzy miejscami sparowanymi z 10 a 11 nukleotydem siRNA/miRNA, licząc od końca 5'; proces ten nie wymaga obecności ATP. Kompleks RISC oddysocjuje (miRNA pozostaje z nim związane) i może wiązać kolejne mRNA. Powstałe w wyniku przecięcia dwa fragmenty mRNA ulegają degradacji przez egzonukleazy komórkowe. Taka sytuacja ma miejsce najczęściej w komórkach roślinnych [27].

Jeśli natomiast sparowanie zasad nie jest doskonałe, co jest niemalże regułą w komórkach zwierzęcych, dochodzi do zahamowania translacji danego transkryptu bez jego zniszczenia (ryc. 1). Jedynym do tej pory opisanym odstępstwem od tej reguły jest mir-196, powodujący przecięcie mRNA genu HOX8B po zahamowaniu jego translacji [34]. Na poziomie komórki negatywna regulacja ekspresji genu w drodze represji translacji jest mniej efektywna niż przez degradację mRNA, chociażby ze względu na prawdopodobnie konieczny dłuższy kontakt pojedynczego kompleksu RISC/siRNA z sekwencją 3'-UTR. Dla osiągnięcia podobnej wydajności najczęściej konieczne jest rozpoznanie i związanie kilku miejsc w obszarze 3'-UTR mRNA genu docelowego przez kilka takich samych bądź różnych miRNA o niepełnej komplementarności (ryc. 1). Zupełnie niejasny natomiast jest mechanizm takiej represji translacji, być może pewną rolę odgrywa w nim asocjujące z białkami Argonaut i miRNA białko FMRP/dFXR, (regulator translacji istotny dla prawidłowego dojrzewania i funkcjonowania komórek nerwowych) [34].

Możliwe, że budowa kompleksu RISC przecinającego mRNA jest nieco inna niż kompleksu hamującego translację, przypuszcza się, że różnica ta dotyczyć może właśnie białek rodziny Argonaut. Badania białka Ago2 wskazują, iż właśnie ono może być enzymem odpowiedzialnym za degradację docelowego mRNA, czyli poszukiwanym „Slicerem”, natomiast za inhibicję translacji odpowiedzialne są prawdopodobnie wszystkie znane białka rodziny Ago [10].

Przeciętne miRNA ma około 100 sekwencji docelowych, co oznacza, iż miRNA wpływają na ekspresję bardzo wielu genów strukturalnych.

POLIMORFIZM LUDZKICH PRE-miRNA

Udowodniono, że integralność w obrębie struktury „szpilki do włosów” ma krytyczne znaczenie dla procesu dojrzewania miRNA, jednak wydaje się, że specyfika nukleotydowa tego fragmentu nie odgrywa większego znaczenia. W wyniku analizy 173 pre-miRNA u 96 osób w 10 z nich stwierdzono występowanie polimorfizmu [18]. W większości przypadków nie naruszały one integralności struktury „hairpin”. Kilka z nich jednak prowadziło do zmian w jej obrębie, co może implikować zaburzenia dojrzewania na etapie działania nukleazy Drosha. W przypadku miR-30c-2 polimorfizm C na A dotyczy nawet sekwencji dojrzałego miRNA, co ma o tyle znaczący wpływ na jego funkcję, że może zmieniać „powinowactwo” do genu docelowego [18].

ROLA miRNA

Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa

Regulacja ekspresji genów przez miRNA ma wpływ na wiele istotnych procesów życiowych, między innymi na przekazywanie sygnału w komórce [34]. Przykładem jest sygnalizacja insulinowa. Udowodniono, że nadekspresja miR-375, zachowanego ewolucyjnie miRNA typowego dla komórek wysepek trzustki, hamuje wydzielanie insuliny wywołane wzrostem poziomu glukozy [28]. Natomiast zahamowanie funkcji endogennej miR-375 powoduje wzrost wydzielania insuliny. Zjawisko to, niezależne od metabolizmu glukozy czy też zmian wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} , okazało się wynikać z bezpośredniego wpływu miR-375 na ekspresję genu *Myotrophiny* (MTPN), co może stanowić obiecujący cel w terapii cukrzycy [28, 34].

miRNA a nowotworzenie

Ostatnie badania wskazują, że zaburzenia w ekspresji miRNA mogą przyczyniać się do rozwoju wielu chorób, w tym powstawania procesu nowotworowego [7]. Jednym z najlepiej poznanych miRNA jest let-7, pierwszy raz opisany u *C. elegans* [31]. Ekspresja homologicznego miRNA występuje w wielu tkankach ludzkich, a szczególnie wysoka jest w tkance płucnej. Natomiast niższą niż normalnie ekspresję let-7 opisano

w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), wykazano także korelację pomiędzy jej poziomem i czasem przeżycia chorych [31]. W układzie *in vitro*, nadekspresja let-7 hamuje wzrost komórek tego nowotworu. Mechanizm tego zjawiska nie jest wyjaśniony, jedna z hipotez zakłada udział let-7 w regulacji kinazy LIM, należącej do rodziny enzymów wpływających na kształt i mobilność komórek, co może implikować ułatwienie powstawania odległych przerzutów. Ostatnie doniesienia sugerują natomiast udział let-7 w negatywnej regulacji onkogenu *RAS* [19].

Niższy poziom ekspresji dojrzałych form ludzkich homologów miR-143 i miR-145 obserwowany jest w stanach przedrakowych i w rakach jelita grubego [24]. Podobnie obniżona ekspresja miR-15 i miR-16 wiąże się z CLL. Opisano mechanizm prowadzący do obniżenia lub braku ekspresji tych miRNA – skupisko (cluster) genów miR15a-miR16 zlokalizowane jest na długim ramieniu chromosomu 13 (13q14), pomiędzy 2 i 5 egzonom genu *LEU2*, czyli na obszarze często ulegającym delecji w przebiegu B-CLL [2, 5, 6, 24].

Ostatnie badania wykazują, że miR-15/16 są negatywnymi regulatorami genu *BCL-2*, co tłumaczyłoby wysoki poziom ekspresji tego genu w B-CLL [6].

Także na chromosomie 13 (13q31), w locus, w którym często dochodzi do amplifikacji w chłoniakach grudkowych, chłoniakach komórek płaszczca, rozlanych chłoniakach olbrzymiokomórkowych, pierwotnych skórnych chłoniakach z komórek B i innych (nieziarnicze chłoniaki złośliwe), mieści się policistronowe skupisko mir-17-92. Analiza linii komórkowych wywodzących się z chłoniaków B-komórkowych wykazała, że poziom prekursorowych i dojrzałych miRNA kodowanych przez geny z tego locus jest dużo wyższy w komórkach nowotworowych w porównaniu z prawidłowymi limfocytami B [16]. W mysim modelu chłoniaka B-komórkowego zwiększona ekspresja mir-17-92 połączona z ekspresją genu *c-myc* przyspiesza rozwój guza, co może wskazywać na onkogenny charakter miRNA wywodzących się z tego skupiska [25]. Produkt ludzkiego onkogenu *c-MYC* może wiązać się bezpośrednio z miRNA zlokalizowanymi w skupisku na chromosomie 13 i powodować ich aktywację [26]. Z kolei dwa miRNA z tego skupiska, miR-17-5p i miR-20a są negatywnymi regulatorami czynnika transkrypcyjnego E2F1. Ponieważ ekspresja E2F1 jest bezpośrednio aktywowana przez białko MYC, oznacza to, że produkt genu *c-MYC* może jednocześnie aktywować i hamować ekspresję E2F1, co umożliwia bardzo precyzyjną kontrolę sygnału do proliferacji [25, 26].

W komórkach chłoniaków B-komórkowych, zwłaszcza w DLBCL (rozlany chłoniak olbrzymiokomórkowy) obserwuje się także znacznie wyższy (20–30x) niż w zdrowych limfocytach B poziom miR-155. Gen kodujący ten miRNA jest, jak się okazało, zlokalizowany w konserwatywnym regionie genu *BIC* (*B-cell receptor inducible gene*), którego nadekspresję w chłoniakach opisano już dawno [9, 24]. Co więcej, poziom ekspresji miR-155 różnicuje pierwotnego DLBCL o fenotypie aktywnych komórek B (ABC) od chłoniaka o fenotypie GC (*germinal center*), co może mieć znaczenie diagnostyczne [9].

Wyniki badań ekspresji 217 miRNA w tkankach zdrowych i nowotworowych wskazują na to, że profil ekspresji tych cząsteczek odróżnia guzy lite od innych nowotworów, różny jest także w zależności od pochodzenia komórek nowotworowych (np. komórki nabłonkowe lub hemopoetyczne) [23]. Odmienną charakterystykę ekspresji miRNA zaobserwowano także w dwu podtypach przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej, różniących się ekspresją kinazy ZAP-70 [3].

Z dotychczasowych badań wynika, że poziom ekspresji miRNA w komórkach zdrowych i nowotworowych jest inny. Może to wynikać z faktu, że większość poznanych genów dla miRNA zlokalizowana jest w miejscach łamliwych (*fra sites*) lub miejscach integracji wirusa HPV (*human papilloma virus*), często ulegających amplifikacji, delecji lub translokacji w przebiegu transformacji nowotworowej [4]. Przypuszczalnie mikro-RNA mogą zachowywać się jak geny supresorowe lub onkogeny (ryc. 2). Zależy to od rodzaju genu docelowego, którego nadekspresja lub wyciszenie jest efektem ostatecznym nieprawidłowej ekspresji miRNA [4, 6].

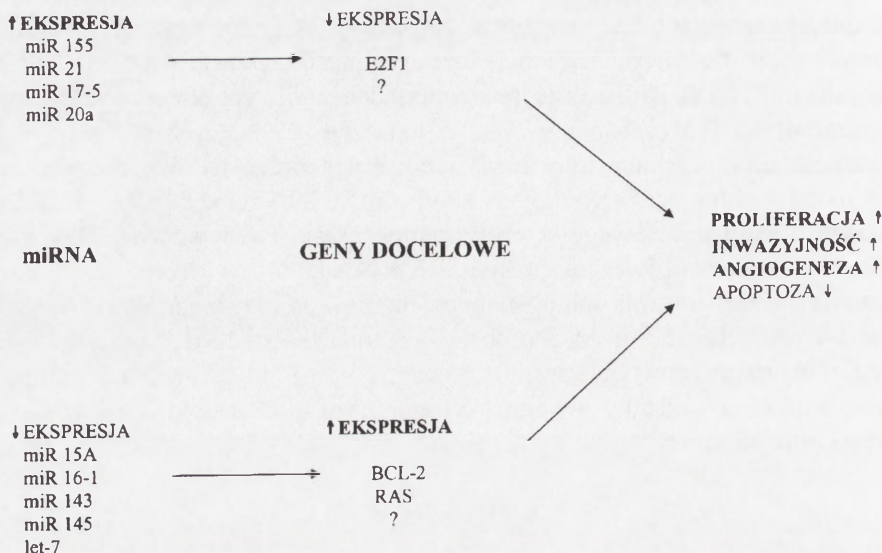
Istotną również jest rola zaburzeń mechanizmów dojrzewania miRNA w karcynogenezie i patogenezie innych chorób [13]. Utrata białka FMRP (*fragile X mental retardation protein*) powoduje zespół kruchego chromosomu X, jedną z najczęstszych przyczyn upośledzenia umysłowego. Wykazano, iż FMRP u ssaków wchodzi w interakcję z kompleksami zawierającymi miRNA, podobnie jak Dicer i AGO1 [34].

miRNA a rozwój

Ekspresja większości miRNA jest tkankowo-specyficzna i zależy od stadium rozwojowego organizmu, co sugerowałoby ich udział w regulacji rozwoju [5, 27]. Potwierdza to fakt, iż indukowane zaburzenia mechanizmów dojrzewania cząsteczek miRNA powodują wczesne obumieranie embrionów. Opisano już szereg miRNA istotnych dla embriogenezy na różnych jej etapach: uwarunkowanych ekspresją genów Hox (schemat rozwoju wzdłuż osi przednio-tylnej), rozwoju układu nerwowego i hematopoezy [27]. Ciekawe doświadczenie wykonano na rybie danio przegowany (*zebrafish*) pozbawiając ją wszystkich aktywnych cząsteczek miRNA poprzez wyłączenie genu kodującego rybonukleazę Dicer, konieczną do prawidłowego ich dojrzewania [17]. U takich mutantów zaobserwowano prawidłową specyfikację osi (zdefiniowanie głównych osi ciała: brzuszno-grzbietowej i przednio-tylnej) i tworzenie planu (seria zdarzeń, w których zróżnicowane komórki są aranżowane przestrzennie, tworząc tkanki i narządy). Poważne defekty pojawiły się dopiero podczas morfogenezy; nieprawidłowości dotyczyły między innymi neurulacji [mezoderma grzbietowa i pokrywająca ją ektoderma wchodzi w interakcję (indukcja), tworząc rynienkę cewy nerwowej, proces ten zapoczątkowuje organogenezę i dzieli ektodermę na trzy populacje komórek: cewę nerwową, naskórek i komórki grzebienia nerwowego], formowania komórek mózgu, ułożenia komórek podczas gastrulacji, rozwoju układu sercowo-naczyniowego etc. Mogłoby to świadczyć o tym, iż wczesne etapy rozwoju embrionalnego, kontrolowane przez geny, takie jak: *Nodal*, *Hedgehog*, *Wnt*, *Notch*, *FGF* i *BMP*, przebiegają bez udziału miRNA, bądź że w dojrzewaniu miRNA dla tych genów docelowych bierze udział rybonukleaza inna niż Dicer. Jednak podobne doświadczenie przeprowadzone na myszkach doprowadziło do śmierci embrionów jeszcze przed etapem specyfikacji osi [17].

miRNA a komórki macierzyste

Jeśli weźmie się pod uwagę zaangażowanie miRNA w regulację rozwoju osobniczego, nie dziwi fakt, że wiele z nich wybiórczo ulega ekspresji w komórkach macierzystych, mogąc wpływać na ich właściwości, takie jak: nieograniczona możliwość samoodnowy przy zachowaniu zdolności



Rycina 2. Udział miRNA w onkogenezie (wg [4, 6] modyfikacja)

do różnicowania i ich pluripotencjalność (za utrzymanie komórek w stanie pluripotencjalnym odpowiada bezpośrednio gen z rodziny POU kodujący czynnik transkrypcyjny Oct4, za zdolność do samoodnowy może odpowiadać LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) aktywujący Stat3. W embrionalnych komórkach macierzystych ES (*embryonic stem*) sklonowano 36 RNA o charakterystyce typowej dla miRNA, z czego 15 okazało się być nowymi, nieopisanymi dotąd cząsteczkami miRNA [30]. Porównując ekspresję miRNA w ES z ekspresją w EC (*embryonic carcinoma*) i innych typach komórek stwierdzono, że są pewne miRNA obecne zarówno w ES, jak w EC (być może odgrywają one konserwatywną rolę w ludzkich pluripotencjalnych komórkach macierzystych); są takie, które ulegają ekspresji wyłącznie w ES (funkcje typowe dla komórek ES?), takie, które są rzadkie w ES, natomiast częste np. w linii HeLa (miRNA, których ekspresja typowa jest dla określonego stadium różnicowania komórki, mogą odpowiadać za regulację rozwoju i różnicowania) i wreszcie takie, których ekspresja jest powszechna (regulacja podstawowych funkcji komórkowych) [30].

Ciekawa jest także obserwacja poziomu ekspresji miRNA ze skupiska miR-12-13-14 (chromosom 19) – obniżenie ich ekspresji następuje wcześniej niż spadek ekspresji genu Oct4, najwcześniej dotychczas poznanego markera komórek ES. Być może właśnie te miRNA są regulatorami najwcześniejszej fazy rozwoju embrionalnego [30].

Ostatnie badania wykazały, że komórki macierzyste muszki owocowej nie poddają się zatrzymaniu cyklu komórkowego (*cell cycle arrest*) dzięki miRNA, które hamują ekspresję genu *Dacapo* (DAP), kodującego inhibitor cyklu komórkowego [12].

BADANIA EKSPRESJI miRNA

Jedną z ciekawych cech charakteryzujących miRNA jest specyfika ich ekspresji, zależna od rodzaju tkanki i/lub stadium rozwojowego. Wczesne badania ekspresji miRNA

wykorzystywały odwrotną transkryptazę i opierały się głównie na hybrydyzacji typu Northern [29]. Jedną z najnowocześniejszych metod badań ekspresji jest analiza mikromacierzy. W klasycznych mikromacierzach jednak często wykorzystuje się do odwrotnej transkrypcji oligo-dT, natomiast dojrzałe miRNA nie mają ogonka poli-A. Kilka grup opracowało ostatnio specyficzne mikromacierze oligonukleotydowe dla miRNA. Oligo-nukleotydy komplementarne do miRNA połączone są kowalencyjnie z membranami (*solid support matrix*) lub syntetyzowane na nich *in situ*. Próbkę miRNA poddaje się odwrotnej transkrypcji z mieszaniną starterów, a powstałe cRNA jest znakowane fluorochromami; miRNA może być też znakowane bezpośrednio. Ostatnio wprowadzono też nowe metody symultanicznego znakowania wieloma fluorochromami, umożliwiające czułą detekcję nawet rzadkich miRNA. Metody te umożliwiają analizę zmian poziomu ekspresji miRNA w czasie i są dokładniejsze niż hybrydyzacja typu Northern [22].

Ponieważ ilość opisanych miRNA stale rośnie, będzie temu zapewne towarzyszyło powstawanie nowych mikromacierzy [34].

POSZUKIWANIE NOWYCH miRNA

Próby poszukiwania nowych miRNA rozpoczęły się już w momencie opisanego genu *let-7* u *C. elegans* [1]. W tym celu przeszukuje się bazy danych wykorzystując programy, takie jak BLASTN, umożliwiające odnalezienie sekwencji homologicznych. Innym sposobem jest wyszukiwanie sekwencji RNA, których budowa sugeruje prawdopodobieństwo tworzenia struktur „szpilki do włosów” (programy Mfold, MiRscan, struktura drugorzędowa). Jeszcze inna jest zasada metody znanej jako cieniowanie filogenetyczne (*phylogenetic shadowing*). Opiera się ona na porównaniu sekwencji gatunków blisko spokrewnionych, co umożliwia identyfikację sekwencji konserwatywnych na poziomie nukleotydowym [1]. Wszystkie do tej pory poznane ludzkie i mysie miRNA oraz ich prekursorzy wpisane są do specjalnego rejestru (*miRNA Registry*).

Poszukiwanie genów docelowych

Przewidywanie sekwencji docelowych dla miRNA u roślin jest dosyć proste, do swojego działania wymagają one bowiem całkowitej homologii z obszarem 3'UTR. U zwierząt sytuację komplikuje fakt, że homologia ta wcale nie musi być pełna, co więcej – większość sekwencji docelowych różni się przynajmniej kilkoma nukleotydami [1, 21]. Zasadniczymi kryteriami wspólnymi dla wszystkich metod poszukiwania genów docelowych są:

- 1) komplementarność pomiędzy 3'UTR potencjalnego genu docelowego a miRNA ze zwróceniem uwagi na krytyczny moment idealnej komplementarności w okolicy 5' końca miRNA,

- 2) konserwatywność docelowych sekwencji 3'UTR pomiędzy genami ortologami,

- 3) kinetyka i termodynamika reakcji pomiędzy miRNA i genem docelowym, określona przy pomocy programu analizującego II-rzędową strukturę RNA (*folding*).

Najbardziej znanym programem do poszukiwania genów docelowych jest algorytm TargetScan (kręgowce), natomiast program zawężający poszukiwania tylko do sekwencji ludzkich to DIANA MicroT [1, 21]. Opisano już wiele przypuszczalnych genów docelowych, na przykład *N-MYC* dla miR-101, *E2F1* dla miR-20 i -106, *SDF1* dla miR-23a i -23b czy *G6PD* dla miR-1 i -206. Potwierdzono jednocześnie, że najważniejszy dla rozpoznania genu docelowego jest konserwatywny region 5' miRNA [21].

Odkrycie miRNA jest jedną z większych niespodzianek genetyki molekularnej, jakie wydarzyły się w ostatnich czasach. Niewielka jest jeszcze nasza wiedza na temat dokładnych mechanizmów działania miRNA i genów, na których ekspresję wpływają. Wiadomo jednak, że badania nad miRNA mogą ułatwić zrozumienie biologii kluczowych procesów życiowych komórek i organizmów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BROWN JR, SANSEAU P. A computational view of microRNAs and their targets. *Drug Discovery Today* 2005; **10**: 595–601.
- [2] CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ADLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15524–15529.
- [3] CALIN GA, LIU C, SEVIGNANI C, FERRACIN M, FELLI N, DUMITRU CD, SHIMIZU M, CIMMINO A, ZUPO S, DONO M, DELL'AQUILA ML, ALDER H, RASSENTI L, KIPPS JT, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. MicroRNA profiling reveals different signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 11755–11760.
- [4] CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD, HYSLOP T, NOCH E, YENDAMURI S, SHIMIZU M, RATTAN S, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2999–3004.
- [5] CHEN C, LODISH HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immun* 2005; **17**: 155.
- [6] CIMMINO A, CALIN GA, FABBRI M, IORIO MV, FERRACIN M, SHIMIZU M, WOJCIK SE, AQEILAN RI, ZUPO S, DONO M, RASSENTI L, ALDER H, VOLINIA S, LIU C, KIPPS TJ, NEGRINI M, CROCE CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 13944–13949.
- [7] CROCE CM, CALIN GA. miRNAs, cancer and stem cell division. *Cell* 2005; **122**: 1–6.
- [8] CULLEN BR. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 2004; **102**: 3–9.
- [9] EIS PS, TAM W, SUN L, CHATBURN A, LI Z, GOMEZ MF, LUND E, DAHLBERG JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **102**: 3627–3632.
- [10] FILIPOWICZ W, JASKIEWICZ L, KOLB FA, PILLAI RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 2005; **15**: 331–341.
- [11] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, **391**: 806–811.
- [12] FLINTOFT L. Small RNAs cross the divide. *Nature* 2005; **435**, 6: 592–593
- [13] GREGORY RI, SHIEKHATTAR R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Canc Res* 2005; **65**: 3509–3512.
- [14] HAASE AD, JASKIEWICZ L, ZHANG H, LAINE S, SACK R, GATIGNOL A, FILIPOWICZ W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 2005; **6**: 961–967.
- [15] HAMMOND SM, CAUDY AA, HANNON GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2001; **2**: 110–119.
- [16] HE L, THOMSON JM, HERMANN MT, HERNANDO-MONGE E, MU D, GOODSON S, POWERS S, CORDON-CARDO C, LOWE SW, HANNON GH, HAMMOND SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; **435**: 828.

- [17] HOBERT O. MicroRNAs: all gone and what? *Curr Biol* 2005; **15**: R387–R389.
- [18] IWAI N, NARABA H. Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Bioch Biophys Res Comm* 2005; **331**: 1440–1444.
- [19] JOHNSON SM, GROSSHANS H, SHINGARA J, BYROM M, JARVIS R, CHENG A, LABOURIER E, REINERT KL, BROWN D, SLACK FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; **120**: 635.
- [20] LEE Y, JEON K, LEE J, KIM S, KIM VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; **21**: 4663–4670.
- [21] LEWIS BP, SHIH I, JONES-RHOADES MW, BARTEL DP, BURGE CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; **115**: 787–798.
- [22] LIU C, CALIN GA, MELOON B, GAMLIEL N, SEVIGNANI C, FERRACIN M, DUMITRU CD, SHIMIZU M, ZUPO S, DONO M, ALDER H, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9740–9744.
- [23] LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BJ, MAK RH, FERRANDO AA, DOWNING JR, JACKS T, HORVITZ HR, GOLUB TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; **435**: 834–838.
- [24] McMANUS MT. MicroRNAs and cancer. *Sem Canc Biol* 2003; **13**: 253–258.
- [25] MELTZER PS. Small RNAs with big impacts. *Nature* 2005; **435**: 745–746.
- [26] O'DONNELL K, WENTZEL EA, ZELLER KI, DANG CV, MENDELL JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; **435**: 839–843.
- [27] PASQUINELLI AM, HUNTER S, BRACHT J. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 200–205.
- [28] POY MN, ELIASSON L, KRUTZFELDT J, KUWAJIMA S, MA X, MACDONALD PE, PFEFFER S, TUSCHL T, RAJEWSKY N, RORSMAN P, STOFFEL M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; **432**: 226–230.
- [29] SCHMITTGEN TD, JIANG J, LIU Q, YANG L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucl Acid Res* 2004; **32**: e43.
- [30] SUH M, LEE Y, KIM JY, KIM S, MOON S, LEE JY, CHA K, CHUNG HM, YOON HS, MOON SY, KIM VN, KIM K. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Develop Biol* 2004; **270**: 488–498.
- [31] TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, TOMIDA S, OSADA H, ENDOH H, HARANO T, YASUSHI Y, NAGINO M, NIMURA Y, MITSUDOMI T, TAKAHASHI T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Canc Res* 2004; **64**: 3753–3756.
- [32] TOMARI Y, ZAMORE PD. MicroRNA biogenesis: Drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol* 2005; **15**: R61–R64.
- [33] LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**: 843–854.
- [34] YANG M, LI Y, PADGETT RW. MicroRNAs: small regulators with big impact. *Cytokine & Growth Factors Rev* 2005; **16**: 387–393.
- [35] WIGHTMAN B, HA I, RUVKUN G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; **75**: 855–862.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 20.10.2005 r.

Przyjęto: 01.12.2005 r.

ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin

aafilip@hotmail.com

UDZIAŁ ŚRÓDBŁONKA W FORMOWANIU SIĘ NACZYŃ

THE ROLE OF ENDOTHELIUM IN VESSELS FORMATION

Kamil Marek LIPSKI¹, Kazimierz OSTROWSKI², Janusz KOMENDER¹,
Dariusz ŚLADOWSKI¹

¹Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek, ²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie: W niniejszym artykule przedstawiono pokrótce stan wiedzy na temat funkcji śródbłonka oraz jego roli w formowaniu się naczyń zarówno w rozwoju zarodkowym, jak i w procesach regeneracyjnych i chorobowych późniejszego życia osobniczego.

Słowa kluczowe: śródbłonek, angiogeneza, VEGF, komórki prekursorowe, komórki macierzyste.

Summary: The paper describes function of endothelium and its role in vessels formation during embryonic development and regenerative or pathological processes of further life.

Key words: endothelium, angiogenesis, VEGF, progenitor cells, stem cells.

Wykaz skrótów: **ACE** (*angiotensin-converting enzyme*) – enzym konwertujący angiotensynę, **Ang** – angiopoetyna, **bFGF** (*basic fibroblast growth factor*) – zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu, **CD** (*cluster of differentiation*) – gronko różnicowania, **CDK** (*cyklin-dependent kinase*) – kinaza zależna od cyklin, **CEPs** (*circulating endothelial progenitor cells*) – krążące prekursorowe komórki śródbłonka, **CLA** (*cutaneous leukocyte antigen*) – antygen leukocytów skóry, **COX** – cyklooksygenaza, **Cx** (*connexin*) – koneksyna, **CXCR-CXC** (*chemokine receptor*) – receptor dla chemokiny CXC, **ECM** (*extracellular matrix*) – substancja pozakomórkowa, **ECs** (*endothelial cells*) – komórki śródbłonka, **EGF** (*epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu, **EPCs** (*endothelial progenitor (precursor) cells*) – komórki prekursorowe śródbłonka, **ESL** (*E-selectin ligand*) – ligand dla E-selektyny, **ET** (*endothelin*) – endotelina, **FGF** (*fibroblast growth factor*) – fibroblastyczny czynnik wzrostu, **HIF** (*hypoxia-inducible factor*) – czynnik indukowany hipoksją, **HRE** (*hypoxia response elements*) – elementy odpowiedzi na hipoksję, **HSCs** (*hematopoietic stem cells*) – komórki macierzyste układu krwiotwórczego, **ICAM** (*intercellular adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej, **ID** (*inhibitors of differentiation*) – inhibitory różnicowania, **IGF** (*insulin-like growth factor*) – insulinopodobny czynnik wzrostu, **IL** (*interleukin*) – interleukina, **ILR** (*interleukin receptor*) – receptor dla interleukiny, **KDR** (*kinase domain region*) – region domeny kinazy, **KGF** (*keratinocyte growth factor*) – czynnik wzrostu keratynocytów, **LFA** (*leukocyte function associated antigen*) – antygen związany z funkcją leukocytów, **LYVE** (*lymphatic vascular endothelial*) – receptor śródbłonka naczyń limfatycznych, **MAC** (*macrophage antigen*) – antygen makrofagalny, **MCP** (*monocyte chemoattractant protein*) –

białko chemotaktyczne monocytów, **MMPs** (*matrix metalloproteinases*) – metaloproteiny macierzy, **nAChRs** (*nicotinic acetylcholine receptors*) – receptory nikotynowe, **NLPZ** – niesteroidowe leki przeciwpalne, **NO** – tlenek azotu, **PAI** (*plasminogen activator inhibitor*) – inhibitor aktywatora plazminogenu, **PDGF** (*platelet-derived growth factor*) – płytkowopochodny czynnik wzrostu, **PDGFR** (*platelet-derived growth factor receptor*) – receptor dla płytkowopochodnego czynnika wzrostu, **PECAM** (*platelet/endothelial cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezyjna płytek/komórek śródbłonka, **PEX** (*C-terminal hemopexin-like domain*) – C-końcowa domena podobna do hemopeksyny, blokująca MMP-2, **PF** (*platelet factor*) – czynnik płytkowy, **PI** – fosfatydyloinozytol, **PIGF** (*placental growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu, **PPARs** (*peroxisome proliferator-activated receptors*) – receptory peroksyosomalnego czynnika proliferacyjnego, **PSGL** (*P-selectin glycoprotein ligand*) – glikoproteinowy ligand dla P-selektyny, **SMCs** (*smooth muscle cells*) – komórki mięśniówki gładkiej, **TGF $\alpha\beta$** (*transforming growth factor $\alpha\beta$*) – transformujący czynnik wzrostu $\alpha\beta$, **TIMPs** (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) – tkankowe inhibitory metaloproteinaz, **TRF** (*TAGGG repeat binding factor*) – czynnik wiążący sekwencje TTAGGG, **TSP** (*thrombospondin*) – trombospondyna, **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) – śródbłonkowy czynnik wzrostu, **VEGFR** (*vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor dla śródbłonkowego czynnika wzrostu, **vWF** (*von Willebrand factor*) – czynnik von Willebranda.

WSTĘP

Układ krwionośny stanowi ważny element spajający poszczególne tkanki i narządy w jeden organizm. Jego rola dostrzegalna jest szczególnie w stanach patologicznych, kiedy zakłócenie funkcji tego układu powoduje zaburzenie działania innych tkanek. Przykładem może być miażdżyca prowadząca często do takich powikłań, jak zawały serca czy udary mózgu [37].

Komórki śródbłonka, oglądane od strony światła naczynia, mają kształt wydłużonych wielokątów (najczęściej sześciokątów) o wymiarach ok. 10 x 30 μm , z osią długą, równoległą do osi naczynia. Grubość cytoplazmy wynosi ok. 0,2 μm , a cytoplazmy i jądra ok. 3 μm . Niektóre komórki śródbłonka żył, tętnic i kapilar (np. w mózgu, grasicy) tworzą połączenia typu *occludens i nexsus*, które sprawiają, że jest on szczelny (wymiana substancji odbywa się poprzez transcytozę). Przechodzenie jonów między komórkami zapewniają połączenia typu *nexsus*. Połączenia te ulegają czasem zerwaniu, zwłaszcza podczas migracji ECs związanej z tworzeniem nowych naczyń, prawidłowych oraz patologicznych nowotworu (w tych ostatnich zwykle nie ulegają ponownemu odtworzeniu) [6]. Także VEGF oraz działająca z nim synergistycznie Ang-2 powodują rozszerzenie tych połączeń, natomiast Ang-1 działa przeciwnie. W przypadku braku tej kostymulacji może dojść do obumarcia komórek śródbłonka [19, 41].

Śródbłonek, szczególnie kapilar i małych tętnic zawiera liczne pory powstałe przez fuzję pęcherzyków, służące do transportu makrocząsteczek [51]. Swoistymi strukturami cytoplazmy endotelium wśierdza, tętnic i żył są pałeczkowate twory o wymiarze 0,2 x 0,4 μm , otoczone błoną – ciała Weibela-Palade'a. Zawierają białko von Willebranda oraz mikrotubule. Śródbłonek, dzięki obecności kompleksów aktyny i miozyny, ma zdolność kurczenia się. Dzięki temu zwiększa się jego przepuszczalność. Na wolnej powierzchni komórek, szczególnie nad jądrami, znajdują się grupy mikrokosmków, a w błonie komórkowej liczne glikoproteiny (tab. 1) [9, 51].

TABELA 1. Glikoproteiny powierzchniowe komórek śródbłónka

Glikoproteiny	Niektóre ich ligandy
Adresyna, CD15	selektyny CD62E,P,L
CD15s; CD34	
CD36	trombospondyna, kolagen
CD39; CD44	
CD 49e	fibronektyna
CD51	
CD54 (ICAM-1)	LFA-1, MAC-1
CD58 (LFA-3)	CD2
CD62E (selektyna E)	ESL-1, CLA, CD62P
CD62P (selektyna P)	PSGL-1, CD24, CD62E
CD73; CDw92 (VIM 15); CD93	
CD102 (ICAM-2)	LFA-1
CD105; CD109; CD121 (IL-1R1); CD 124 (IL-4R α IL-13R α ; CD140b (PDGFR α); CD142 (czynnik tkankowy); CD143 (ACE); CD144 (VE-kadheryna); CDw145; CD146; CD147; CD157; CD166	

Śródbłonek bierze udział w transporcie gazów i substancji chemicznych, w sposób bierny – zgodny z gradientem stężeń (np. O₂, CO₂) lub czynny – głównie przez transcytozę. Przez pory oraz przestrzenie międzykomórkowe mogą przechodzić leukocyty i erytrocyty – diapedeza.

Komórki syntetyzują i uwalniają hormony miejscowe: prostacyklinę PGI₂ (przeciwdziała agregacji płytek i rozszerza naczynia), inne prostaglandyny oraz endoteliny ET-1, ET-2, ET-3 (21-aminokwasowe peptydy powstające z 200-aminokwasowych proendotelin, kurczące mięśniówkę naczyń oraz będące mitogenami).

Śródbłonek wytwarza również tlenek azotu NO, przez który działają rozkurczająco na naczynia takie substancje, jak: acetylocholina, histamina, bradykinina, substancja P i inne. Endotelium wydziela także Ang I i Ang2 oraz konwertazę powodującą przejście angiotensyny-1 w angiotensynę-2. PDGFB, uwalniany z ECs po stymulacji VEGF, wpływa głównie na tworzenie się i dojrzewanie ściany naczyń.

RÓŻNICE POMIĘDZY ŚRÓDBŁONKIEM TĘTNICZYM, ŻYLNYM I LIMFATYCZNYM

Śródbłonek wyściela naczynia krwionośne, limfatyczne i jamy serca. Nie wszystkie jego komórki są identyczne. Istnieją różnice pomiędzy EC tętnic i żył [3]. Szlak Notch, aktywowany ligandami (Delta-like-4, Jagged-1, Jagged-2) łączącymi się z receptorami (Notch-1, Notch-3, Notch-4) promuje wystąpienie fenotypu tętniczego, hamuje natomiast różnicowanie się w kierunku śródbłonka żylnego [34, 67]. Aktywowany jest także przez elementy innych szlaków, np. Sonic Hedgehog, VEGF czy Gridlock [35]. Ta plastyczność ECs, umożliwiająca zmianę fenotypu, występuje także poza okresem płodowym, u noworodków (m.in. w siatkówce) oraz u osobników dorosłych (np. w sercu) [55, 60].

Odkryte zostały specyficzne antygeny (z systemu Eph-Ephrin) dla śródbłonka tętniczego i żylnego. Obecność EphrinB2 jest charakterystyczna dla nabłonka i mięśniówki gładkiej tętniczej oraz kapilar, natomiast EphB4 (receptor dla EphrinB2) – dla śródbłonka żylnego. System EphrinB2-EphB4 zapobiega przenikaniu i migracji ECs na granicy tętniczo-żylny w tworzeniu się anastomoz tętniczo-żylnych [17, 61, 66]. W patologicznej angiogenezie, na powierzchni nabłonka niektórych nowych naczyń występuje EphrinB2, co stoi w sprzeczności z uznawaną powszechnie teorią, że naczynia guza powstają z żyłek pozakapilarnych [12, 52].

Nie jest do końca jasne pochodzenie śródbłonka naczyń limfatycznych: czy wywodzi się on z naczyń żylnych, które przekształciły się we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego, czy z limfangioblastów mezenchymy [28, 63, 64]. Na endotelium naczyń limfatycznych znajdują się charakterystyczne receptory VEGFR3 i LYVE1 [62]. Aktywacja szlaku Syk-SLP76 powoduje płodową separację sieci naczyń krwionośnych i limfatycznych. Odpowiedź komórek śródbłonka naczyń limfatycznych na pozostałe cytokiny jest podobna jak ich odpowiedników w układzie krwionośnym [27].

RÓŻNICE NARZĄDOWE

Endotelium naczyń różnych narządów ma na swojej powierzchni specyficzne dla danego organu antygeny. Przykładem może być nabłonek, pochodzący z płuc, gruczołów piersiowych czy prostaty, mający odpowiednio: błonową dipeptydazę, aminopep-tydazę P oraz IL-11. Dla śródbłonka naczyń nowotworowych charakterystyczna jest natomiast aminopeptydaza N. Ta specyficzność antygenowa może mieć przyszłe implikacje terapeutyczne, np. możliwość zastosowania przeciwciał monoklonalnych z przytwierdzonymi do nich radioizotopami, chemioterapeutykami bądź inhibitorami angiogenezy wybiórczo hamującymi rozwój nowotworu, czy inne metody podawania leku bezpośrednio do miejsc docelowych. Terapia taka zapewniłaby większą wybiórczość, a co za tym idzie, zmniejszyłaby liczbę działań niepożądanych [5].

W szczególnych przypadkach śródbłonek może być zastąpiony przez: cytotrofoblast w matczynych tętnicach spiralnych podczas tworzenia się łożyska (pseudowaskulogeneza),

komórki mięśniówki gładkiej tworzące neointimę w przypadku niekompletnej odbudowy śródbłonna po uszkodzeniu, czy komórki nowotworowe (mimikra naczyńniowa) [54].

Śródbłonek większości naczyń krwionośnych jest jednowarstwowy, płaski i leży na błonie podstawnej. W zatokach śledziony i żyłkach węzła limfatycznego, kępek Peyera i migdałków jest nabłonkiem jednowarstwowym sześciennym. W przypadku kłębuszków nerkowych, porowaty śródbłonek naczyń włosowatych stanowi jeden z elementów filtru kłębuszkowego, zatrzymującego komórki, cząstki i makrocząsteczki, a przepuszczaającego płyn i molekuly o masie cząsteczkowej do 1 mln. Wytwarza również kolejny ze składników systemu filtracyjnego – błonę podstawną.

Istnieją również różnice w ekspresji genów pomiędzy różnego rodzaju ECs (zarówno tych pochodzących z prawidłowych tkanek, jak i tych z naczyń nowotworowych, z naczyń embrionalnych oraz przebudowujących, gojących się). Zagadnienia te zostały wstępnie scharakteryzowane, jednak wymagają dalszego dogłębnego zbadania.

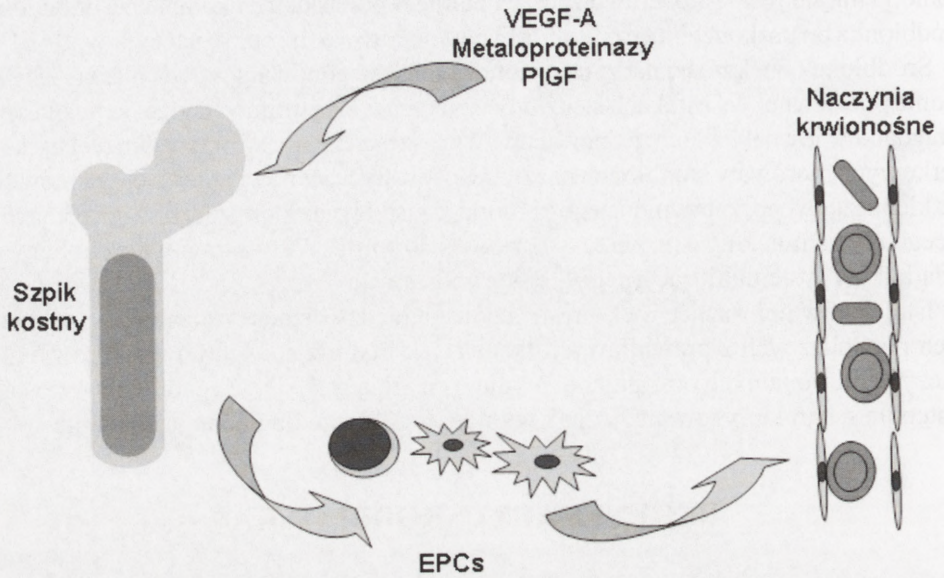
REGENERACJA ŚRÓDBŁONKA

Średni czas życia komórek śródbłonna wynosi ok. 100 dni, w związku z tym konieczne jest ich ciągłe odtwarzanie w celu utrzymania ciągłości tej warstwy ściany naczynia.

Jednym ze spostrzeżeń poczynionych w badaniach *in vivo* jest obserwacja dotycząca szybszego skracania się telomerów w komórkach śródbłonna naczyń, które najczęściej są dotknięte zmianami miażdżycowymi (takie jak np. tętnice wieńcowe). Istnieją miejsca, np. tętnice biodrowe, gdzie śródbłonek jest szczególnie narażony na działanie sił hemodynamicznych. Występuje w nich znaczna proliferacja komórek, a w jej następstwie szybsze skracanie telomerów i zwiększone ryzyko wystąpienia miażdżycy [30]. W hodowlach *in vitro*, ECs z zaburzoną funkcją telomerów (wyłączonym genem dla białka TRF2) mają zahamowaną proliferację oraz zmieniony fenotyp. Są powiększone, zwiększa się ekspresja inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (*cyclin-dependent kinase*, CDK), ICAM-1, spada natomiast produkcja tlenu azotu przez śródbłonną syntetazę tlenu azotu. Podobne zmiany występują także w replikacyjnym starzeniu się niezmiennych komórek (po około 50 podziałach). Komórki te mają również większą aktywność β -galaktozydazy, enzymu charakterystycznego dla „starych” komórek [43].

W niekorzystnych warunkach, takich jak: zmniejszenie przepływu czy stężenia różnych substancji (np. VEGF, bFGF, MMPs, PDGF czy NO), może nastąpić regresja naczyń. Przykładem może być zanik kłębuszków nerkowych w przypadku braku VEGF [15, 32].

Komórki śródbłonna pochodzą z angioblastów płodu (podobne pochodzenie jak komórek krwi) [42] oraz z komórek prekursorowych śródbłonna (mogą także wydzielać czynniki wzrostu naczyń) [48] i komórek macierzystych szpiku u dorosłych [39, 49]. Wszystkie te rodzaje komórek mają podobne antygeny, receptory dla podobnych cytokin (np. VEGF, PlGF, angiopoetyny (Ang)-1, ID) oraz mogą przekształcać się jedne w drugie (np. HSCs mogą powstawać w życiu płodowym z komórek śródbłonna, a leukocyty i HSCs mogą zarówno przekształcać się w EC, jak i stymulować formowanie naczyń), różnią się natomiast czasem i miejscem występowania [16, 18, 21, 39, 40, 57].



RYCINA 1. Regeneracja śródbłonna naczyń przy pomocy EPCs (*endothelial progenitor (precursor) cells* – komórek prekursorowych śródbłonna)

Także w późniejszych etapach życia istnieje grupa komórek: krążące śródbłonkowe komórki prekursorowe, wywodząca się głównie ze szpiku i mająca znaczenie w naprawie uszkodzonych naczyń oraz wzroście guzów. Ludzkie EPCs charakteryzują się obecnością antygenów powierzchniowych, takich jak np. CD31, CD34, CD133, CD146, CXCR4, c-Kit, *VE-cadherin*, VEGFR2, vWF. W stanie spoczynku CEPs VEGFR⁺ stanowią tylko 0,01% jądrzastych komórek krwi. Jeżeli konieczny jest wzrost śródbłonna, następuje mobilizacja tych komórek (ich liczba we krwi w ciągu 24 godzin wzrasta do 12%), po czym osiadają one w miejscach, gdzie został odsłonięty kolagen i fibronektyna, a następnie, w zależności od działających na nie czynników, przekształcają się w śródbłonek (pod wpływem VEGF-A) lub mięśniówkę gładką (dzięki obecności PDGF). Uważa się, że VEGF-A, metaloproteinazy oraz PIGF są odpowiedzialne za uwalnianie komórek prekursorowych ze szpiku (ryc. 1). Komórki prekursorowe mają zdecydowanie większe zdolności proliferacyjne niż dojrzałe ECs [47].

WPLYW LOKALNYCH CZYNNIKÓW REGULACYJNYCH NA ŚRÓDBŁONEK I FORMOWANIE SIĘ NACZYŃ

Jednym z czynników sterujących procesem kształtowania się naczyń jest różna ekspresja i działanie ogólnoustrojowych cytokin regulujących angiogenezę, takich jak VEGF czy Ang-1 (w tkankach (guzach), z naczyniami o niskiej przepuszczalności

występuje wysoki poziom Ang-1 oraz niski VEGF, natomiast w tych z dużą przepuszczalnością często brakuje Ang-1) [26]. VEGF działa w tym przypadku przez zwiększenie stężenia wapnia w komórce, jej obkurczenie i fenestrację. Ang-1 stymuluje angiogenezę w skórze, natomiast działa na nią hamująco w sercu [56].

Innymi poznanymi cytokinami specyficznymi dla narządów i tkanek są *blood vessel/epicardium substance* i fibulina-2 w sercu oraz EG-VEGF i prokinetyna-2 w gruczołach endokrynnych [36].

Ważnymi cytokinami działającymi na komórki śródbłonka jest rodzina VEGF, składająca się z: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i PlGF. VEGF-A wpływa głównie na wzrost naczyń krwionośnych, natomiast VEGF-C i VEGF-D regulują wzrost naczyń limfatycznych [10, 33]. W doświadczeniach *in vitro* VEGF zapobiega apoptozie ECs (przez receptor VEGFR-2) także w warunkach braku surowicy. Dzieje się tak dzięki uaktywnieniu szlaku: kinaza fosfatydyloinozytolowa (PI)-3 – Akt [13] oraz zwiększeniu ekspresji białek antyapoptotycznych: Bcl-2 i A1 [14]. Działanie to zmienia się wraz z wiekiem (np. u myszy, blokowanie VEGF prowadzi do apoptozy ECs u noworodków, ale nie u dorosłych osobników). VEGF powoduje również, w sposób zależny od dawki, rozszerzenie naczyń poprzez stymulację wydzielania śródbłonkowego tlenu azotu.

VEGF działa przez kilka receptorów: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (*KDR-kinase domain region*, FLK-1 (nie wiąże VEGF-B)) należące do rodziny kinaz tyrozynowych, VEGFR-3 (Flt-4 (wiąże VEGF-C i VEGF-D)) oraz rodzinę ko-receptorów – neurofiliny.

VEGFR-1, którego ekspresję zwiększa hipoksja (przez wzrost poziomu HIF), jest receptorem dla VEGF-A, VEGF-B oraz PlGF. Poza odpowiedzią związaną z fosforylacją tyrozyn proponuje się także możliwość funkcjonowania VEGFR-1 jako receptora-pułapki (występuje również w rozpuszczalnej formie), wiążącego VEGF i uniemożliwiającego jego połączenie z innymi receptorami (np. VEGFR-2). Nie jest do końca jasne czy receptor ten ma działanie anty- (ma w swojej budowie motyw zapobiegający aktywacji kinazy PI-3) czy promitogenne (np. przez aktywację antyapoptotycznego genu dla surwiwiny).

Myszy ze zmutowanym genem dla VEGFR-1 giną we wczesnym okresie życia płodowego w wyniku braku tworzenia się cewek naczyniowych. Następuje natomiast silna proliferacja angioblastów (co dodatkowo przemawia za antymitogennym działaniem VEGFR-1). Poza tym VEGFR-1 stymuluje komórki śródbłonka do wydzielania metaloproteinaz macierzy (MMP9) oraz innych enzymów proteolitycznych.

Inne działanie ma natomiast VEGFR-2. Powoduje on proliferację oraz migrację komórek biorących udział w angiogenezie. Po połączeniu się z ligandem receptor ulega dimeryzacji i następuje fosforylacja reszt tyrozynowych w białkach, takich jak: fosfolipaza C- γ , kinaza PI-3, białko aktywujące GTPazę Ras czy rodzinę protein Src. Aktywowany jest również szlak Raf-Mek-Erk (przy pomocy kinazy C, ale bez użycia Ras).

Istnieje szereg czynników zwiększających wydzielanie VEGF. Są to: EGF, TGF- α i - β , KGF, IGF-1, FGF, PDGF, cytokiny zapalne: IL-1 α , IL-6 (jest to jeden z możliwych mechanizmów promujących zwiększenie unaczynienia zmienionych zapalnie i nowotworowo tkanek) oraz niektóre hormony (np. testosteron).

Kolejnym czynnikiem stymulującym angiogenezę jest hipoksja, stymulująca komórki do wydzielania takich substancji, jak: VEGF, PDGF czy HIF.

HIF-1 jest heterodimerem $\alpha\beta$, który został odkryty jako indukowane przez hipoksję białko wiążące się z DNA, zwiększające poziom promotora genu dla erytropoetyny. Jednak jego obecność stwierdzono również w komórkach nieprodukujących erytropoetyny, co sugerowało także inne jego funkcje. Podjednostki α i β są izoformami kodowanymi przez geny z różnych loci. Podjednostka HIF-1 β jest konstytutywnym białkiem jądrowym, natomiast HIF- α jest indukowana przez niedotlenienie. Z trzech izoform HIF- α , dwie (HIF-1 α i HIF-2 α) indukują (wspólnie z HRE) transkrypcję, natomiast HIF-3 α ją hamuje. Jednym z głównych mechanizmów działania proangiogenetycznego HIF (a zwłaszcza HIF-1) jest zwiększenie ekspresji VEGF. Po zwiększeniu dostępności tlenu do komórek HIF szybko ulega proteolizie [46].

Cytokiny z rodziny TGF- β mogą wpływać na dojrzewające naczynia w sposób zależny od stężenia. W niskim stężeniu TGF- β 1 promuje angiogenezę przez zwiększenie ekspresji innych cytokin oraz proteaz, natomiast w wysokich dawkach hamuje wzrost śródbłonna oraz sprzyja różnicowaniu SMCs i przebudowie błony podstawnej.

Ostatnio wykazano, że także nikotyna może promować angiogenezę przez aktywację receptorów nikotynowych na powierzchni komórek śródbłonna. Mekamylamina, bloker nAChR, powoduje zniesienie tego efektu. Aktywacja tego receptora powoduje również wzrost poziomu VEGF. Nikotyna stymuluje także produkcję takiego promotora angiogenezy, jak MCP1 [22].

Kolejnym szlakiem metabolicznym wpływającym na angiogenezę jest układ związany z PPARs – jest to rodzina 3 izotypów receptorów (α , β i γ), będących wewnątrzkomórkowymi „czujnikami” dla kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, transkrypcyjnie regulujących metabolizm tłuszczów i glukozy. Aktywacja tych receptorów powoduje zahamowanie angiogenezy poprzez zatrzymanie proliferacji ECs (a przy większych stężeniach ligandów nawet ich apoptozę), blokowanie ich migracji i formowania się tub. Jako molekularny mechanizm wyjaśnienia tego zjawiska postuluje się wpływ szlaku PPARs na dezorganizację cytoszkieletu aktynowego, zmniejszenie indukowanej przez bFGF aktywacji Akt i ekspresji genu dla COX-2 oraz zmniejszenie produkcji chemokin z rodziny CXC. Niektóre aktywatory PPARs (np. fenofibrat) mogą znaleźć kliniczne zastosowanie, np. przy hamowaniu angiogenezy nowotworowej [11, 31, 44, 59].

Z układem PPARs związane są COX-1 i COX-2 – izoenzymy biorące udział w przemianach kwasu arachidonowego i jego pochodnych. Produkty tych przemian (np. prostaglandyny) znane są ze swego proangiogenego działania (zwiększają proliferację i migrację ECs), m.in. przez: aktywację mediowanej przez integrinę $\alpha_v\beta_3$ i zależnej od cAMP/PKA GTPazy Rac i Cdc42; zwiększenie ekspresji CXCR4. Istnieje również interakcja między COX (głównie COX-2) a innymi proangiogennymi czynnikami, takimi jak VEGF, bFGF – substancje te pobudzają wzajemnie swoją syntezę. Jest to prawdopodobnie jedna z przyczyn nadmiernej angiogenezy obserwowanej w miejscach objętych przewlekłym procesem zapalnym oraz guzach nowotworowych (w niektórych potwierdzono doświadczalnie zwiększoną ekspresję COX-2). Zahamowanie tego działania przy użyciu NLPZ (blokujących COX), takich jak np. kwas acetylosalicylowy, może być jednym z mechanizmów przeciwnowotworowej aktywności tej grupy leków [4, 7, 8, 29, 50, 58, 65].

WPLYW SKŁADNIKÓW MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ NA TWORZENIE SIĘ NACZYŃ

Ważnym czynnikiem wpływającym na proliferację i różnicowanie komórek śródbłonna, a także na formowanie się nowych naczyń jest ECM, składająca się m.in. z: kolagenu IV, lamininy, fibronektyny, fibryny, kolagenu I, elastyny. Podczas tworzenia się nowych wypustek naczyniowych substancje, takie jak: aktywatory i inhibitory plazminogenu (np. urokinaza, PAI-1), MMPs, TIMPs, heparyny, chymazy, tryptazy oraz katepsyny, nie tylko degradują istotę międzykomórkową, tworząc przestrzeń dla nowych naczyń, ale także odsłaniają epitopy (np. kolagen IV), uwalniają z macierzy cytokiny (zarówno te aktywujące: bFGF, VEGF, TGF- β , IL-1 β , jak i hamujące angiogenezę: TSP-1, kanstatynę, tumstatynę, endostatynę oraz PF-4) oraz zmieniają strukturę okolicznych białek (np. kolagenu fibrylarnego), co dodatkowo stymuluje i kierunkuje migrację komórek śródbłonna i mięśniówki gładkiej. Ta ich plejotropowa aktywność może zależeć od stężenia oraz miejsca, w którym działają [2, 20, 25, 38, 45].

Na kierunek ruchu komórek śródbłonna w czasie angiogenezy wpływa również obecność lub brak pewnych substancji istoty międzykomórkowej – osteopontyny oraz kwasu hialuronowego, które przejściowo wiąże się z błonową glikoproteiną komórek śródbłonna – CD44.

Także integryny (zwłaszcza $\alpha_v\beta_3$ oraz $\alpha_v\beta_5$), będące powierzchniowymi receptorami dla specyficznych ligandów macierzy pozakomórkowej, modulują proces waskulogenezy [1, 23, 24]. Ich działanie nie jest jednak do końca jasne. Próby z użyciem ich antagonistów wskazują na działanie stymulujące, natomiast doświadczenia z wyłączeniem funkcji kodujących je genów sugerują zahamowanie angiogenezy (prawdopodobnie w drodze zmniejszenia przeżycia ECs mediowanego przez VEGF i Flk-1, blokowania innych integryn, przekazywania antyangiogenetycznej aktywności TSPs, tumstatyny, endostatyny, angiostatyny oraz PEX).

Komórki endotelium tego samego typu łączą się przez CD31 (PECAM) oraz Cx (koneksyny), dodatkowo umożliwiające ich wzajemną komunikację. Zmniejszenie poziomu Cx37 i Cx40 powoduje tworzenie naczynek jamistych, a brak Cx43 zaburza formowanie tętnic wieńcowych [53].

W powyższej pracy omówiono tylko niektóre spośród wielu zjawisk, w jakie zaangażowany jest śródbłonek. Odgrywa on ważną rolę w trakcie formowania się naczyń zarówno w rozwoju zarodkowym, jak i w procesach regeneracyjnych oraz chorobowych późniejszego życia osobniczego. Dlatego też konieczne są dalsze badania nad jego funkcją oraz udziałem w przemianach biologicznych.

PIŚMIENICTWO

- [1] ADAMIEC J, OFICJALSKA-MŁYŃCZAK J. Rola komórkowych cząsteczek adhezyjnych w rozwoju proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej. *Klin Oczna* 2005; **107**: 330–333.
- [2] BEDNARSKA-CHABOWSKA D, ADAMIEC R, PAWLIKOWSKI A, ADAMIEC J. Wybrane problemy funkcjonowania śródbłonna. II. Rola selekty w uszkodzeniach śródbłonna naczyń. *Pol Merkuriusz Lek* 2002; **12**: 329–332.
- [3] CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; **9**: 653–660.
- [4] CHU J, LLOYD FL, TRIFAN OC, KNAPP B, RIZZO MT. Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in the regulation of tumor-associated angiogenesis and growth in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**: 1–7.
- [5] CLEAVER O, MELTON DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003; **9**: 661–668.
- [6] CORADA M, ZANETTA L, ORSENIIGO F, BREVIARIO F, LAMPUGNANI MG, BERNASCONI S, LIAO F, HICKLIN DJ, BOHLEN P, DEJANA E. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* 2002; **100**: 905–911.
- [7] DAVIES G, SALTER J, HILLS M, MARTIN LA, SACKS M, DOWSETT M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 2651–2656.
- [8] DORMOND O, RUEGG C. Regulation of endothelial cell integrin function and angiogenesis by COX-2, cAMP and Protein Kinase A. *Thromb Haemost* 2003; **90**: 577–585.
- [9] FELESZKO W. Załącznik – wykaz cząsteczek CD. W: Jakóbsiak M. Immunologia. Warszawa: Wydaw. Naukowe PWN 1998: 653–663.
- [10] FERRARA N, GERBER HP, LeCOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**: 669–676.
- [11] GACKA M, ADAMIEC R. Mutacje genu receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (PPaγ) – implikacje kliniczne. *Post Hig Med Dosw (Online)* 2004; **58**: 483–489.
- [12] GALE NW, BALUK P, PAN L, KWAN M, HOLASH J, DECHIARA TM, McDONALD DM, YANCOPOULOS GD. Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol* 2001; **230**: 151–160.
- [13] GERBER HP, MCMURTREY A, KOWALSKI J, YAN M, KEYT BA, DIXIT V, FERRARA N. VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; **273**: 30343–30366.
- [14] GERBER HP, DIXIT V, FERRARA N. Vascular endothelial growth factor induces expression of antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13313–13316.
- [15] GERBER HP, HILLAN KJ, RYAN AM, KOWALSKI J, KELLER GA, RANGELL L, WRIGHT BD, RADTKE F, AGUET M, FERRARA N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; **126**: 1149–1159.
- [16] GERBER HP, MALIK AK, SOLAR GP, SHERMAN D, LIANG XH, MENG G, HONG K, MARSTERS JC, FERRARA N. VEGF regulates haemopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002; **417**: 954–958.
- [17] GERETY SS, WANG HU, CHEN ZF, ANDERSON DJ. Symmetrical mutant phenotypes of receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand EphrinB2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 1999; **4**: 403–414.
- [18] GRANT MB, MAY WS, CABALLERO S, BROWN GA, GUTHRIE SM, MAMES RN, BYRNE BJ, VAUGHT T, SPOERRI PE, PECK AB, SCOTT EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; **8**: 607–612.
- [19] HACKETT SF, WIEGAND S, YANCOPOULOS G, CAMPOCHIARO PA. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J Cell Physiol* 2002; **192**: 182–187.
- [20] HANGAI M, KITAYA N, XU J, CHAN CK, KIM JJ, WERB Z, RYAN SJ, BROOKS PC. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol* 2002; **161**: 1429–1437.
- [21] HATTORI K, HEISSIG B, WU Y, DIAS S, TEJADA R, FERRIS B, HICKLIN DJ, ZHU Z, BOHLEN P, WITTE L, HENDRIKX J, HACKETT NR, CRYSTAL RG, MOORE MA, WERB Z, LYDEN D, RAFIIS. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1⁺ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; **8**: 841–849.
- [22] HECHT SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; **4**: 733–744.
- [23] HOOD JD, CHERESH DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 91–100.

- [24] HYNES RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 2002; **8**: 918–921.
- [25] JACKSON C. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; **11**: 295–299.
- [26] JAIN RK, MUNN LL. Leaky vessels? Call Ang-1! *Nat Med* 2000; **6**: 131–132.
- [27] JAIN RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; **9**: 685–693.
- [28] JELTSCH M, TAMMELA T, ALITALO K, WILTING J. Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* 2003; **314**: 69–84.
- [29] JOO YE, REW JS, SEO YH, CHOI SK, KIM YJ, PARK CS, KIM SJ. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; **37**: 28–33.
- [30] KAZMIERSKI R. Biomechaniczne siły ścinania występujące w tętnicach szyjnych a rozwój miażdżycy. *Post Hig Med Dosw* 2003; **57**: 713–725.
- [31] KESHAMOUNI VG, ARENBERG DA, REDDY RC, NEWSTEAD MJ, ANTHWAL S, STANDIFORD TJ. PPAR- γ activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 2005; **7**: 294–301.
- [32] KITAMOTO Y, TOKUNAGA H, TOMITA K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2351–2357.
- [33] KOWALCZYK J, PASYK S. Śródbłonkowy czynnik wzrostu i jego zastosowanie w terapii chorób sercowo-naczyniowych. *Pol Merkuriusz Lek* 2002; **13**: 74–78.
- [34] LAWSON ND, SCHEER N, PHAM VN, KIM CH, CHITNIS AB, CAMPOS-ORTEGA JA, WEINSTEIN BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 2001; **128**: 3675–3683.
- [35] LAWSON ND, VOGEL AM, WEINSTEIN BM. Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* 2002; **3**: 127–136.
- [36] LeCOUTER J, KOWALSKI J, FOSTER J, HASS P, ZHANG Z, DILLARD-TELM L, FRANTZ G, RANGELL L, DeGUZMAN L, KELLER GA, PEALE F, GURNEY A, HILLAN KJ, FERRARA N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001; **412**: 877–884.
- [37] LESNIAK W, KOLASINSKA-KLOCH W, KIEC B. Śródbłonek naczyń – funkcja, zaburzenia i kliniczne próby modyfikacji. *Folia Med Cracov* 2001; **42**: 5–14.
- [38] LUTTUN A, DEWERCHIN M, COLLEN D, CARMELIET P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep* 2000; **2**: 407–416.
- [39] LUTTUN A, CARMELIET G, CARMELIET P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2002; **12**: 88–96.
- [40] LYDEN D, HATTORI K, DIAS S, COSTA C, BLAIKIE P, BUTROS L, CHADBURN A, HEISSIG B, MARKS W, WITTE L, WU Y, HICKLIN D, ZHU Z, HACKETT NR, CRYSTAL RG, MOORE MA, HAJJAR KA, MANOVA K, BENEZRA R, RAFII S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; **7**: 1194–1201.
- [41] MAISONPIERRE PC, SURI C, JONES PF, BARTUNKOVA S, WIEGAND SJ, RADZIEJEWSKI C, COMPTON D, MCCLAIN J, ALDRICH TH, PAPADOPOULOS N, DALY TJ, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; **277**: 55–60.
- [42] MIKKOLA HK, ORKIN SH. The search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; **11**: 9–17.
- [43] MINAMINO T, MIYAUCHI H, YOSHIDA T, ISHIDA Y, YOSHIDA H, KOMURO I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; **105**: 1541–1544.
- [44] PANIGRAHY D, SINGER S, SHEN LQ, BUTTERFIELD CE, FREEDMAN DA, CHEN EJ, MOSES MA, KILROY S, DUENSING S, FLETCHER C, FLETCHER JA, HLATKY L, HAHNFELDT P, FOLKMAN J, KAIPAINEN A. PPAR- γ ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; **110**: 923–932.
- [45] PEPPER MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 346–355.
- [46] PUGH CW, RATCLIFF PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the Hif system. *Nat Med* 2003; **9**: 677–684.
- [47] RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9**: 702–712.
- [48] REHMAN J, LI J, ORSCHELL CM, MARCH KL. Peripheral blood „endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; **107**: 1164–1169.

- [49] REYES M, DUDEK A, JAHAGIRDAR B, KOODIE L, MARKER PH, VERFAILLIE CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; **109**: 337–346.
- [50] SALCEDO R, ZHANG X, YOUNG HA, MICHAEL N, WASSERMAN K, MA WH, MARTINS-GREEN M, MURPHY WJ, OPPENHEIM JJ. Angiogenic effect of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003; **102**:1966–1977.
- [51] SAWICKI W. Śródbłonek. W: Sawicki W. Histologia. Wydaw. Lekarskie PZWL, Warszawa 2003: 236–239.
- [52] SHIN D, GARCIA-CARDENA G, HAYASHI S, GERETY S, ASAHARA T, STAVRAKIS G, ISNER J, FOLKMAN J, GIMBRONE MA Jr, ANDERSON DJ. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol* 2001; **230**: 139–150.
- [53] SIMON AM, McWHORTER AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction protein connexin37 and connexin40. *Dev Biol* 2002; **251**: 206–220.
- [54] SOOD AK, FLETCHER MS, HENDRIX MJ. The embryonic-like properties of aggressive human tumor cells. *J Soc Gynecol Investig* 2002; **9**: 2–9.
- [55] STALMANS I, NG YS, ROHAN R, FRUTTIGER M, BOUCHE A, YUCE A, FUJISAWA H, HERMANS B, SHANI M, JANSEN S, HICKLIN D, ANDERSON DJ, GARDINER T, HAMMES HP, MOONS L, DEWERCHIN M, COLLEN D, CARMELIET P, D'AMORE PA Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 2002; **109**: 327–336.
- [56] SURI C, McCLAIN J, THURSTON G, McDONALD DM, ZHOU H, OLDMIXON EH, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998; **282**: 468–471.
- [57] TAKAKURA N, WATANABE T, SUENOBU S, YAMADA Y, NODA T, ITO Y, SATAKE M, SUDA T. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000; **102**: 199–209.
- [58] TAMURA M, SEBASTIAN S, GURATES B, YANG S, FANG Z, BULUN SE. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 3505–3507.
- [59] VARET J, VINCENT L, MIRSHAHI P, PILLE JV, LEGRAND E, OPOLON P, MISHAL Z, SORIA J, LI H, SORIA C. Fenofibrate inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**: 810–819.
- [60] VISCONTI RP, RICHARDSON CD, SATO TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8219–8224.
- [61] WANG HU, CHEN ZF, ANDERSON DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; **93**: 741–753.
- [62] WAS H. Charakterystyka antygenów i czynników wzrostu śródbłonka limfatycznego. *Post Biochem* 2005; **51**: 209–214.
- [63] WILTING J, PAPOUTSI M, BECKER J. The lymphatic vascular system: secondary or primary? *Lymphology* 2004; **37**: 98–106.
- [64] WILTING J, TOMAREV SI, CHRIST B, SCHWEIGERER L. Lymphangioblasts in embryonic lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2003; **1**: 33–40.
- [65] YAZAWA K, TSUNO NH, KITAYAMA J, KAWAI K, OKAJI Y, ASAKAGE M, SUNAMI E, KAISAKI S, HORI N, WATANABE T, TAKAHASHI K, NAGAWA H. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 inhibits endothelial cell proliferation by induction of cell cycle arrest. *Int J Cancer* 2005; **113**: 541–548.
- [66] ZHANG XQ, TAKAKURA N, OIKE Y, INADA T, GALE NW, YANCOPOULOS GD, SUDA T. Stromal cells expressing ephrin-B2 promote the growth and sprouting of ephrin-B2(+) endothelial cells. *Blood* 2001; **98**: 1028–1031.
- [67] ZHONG TP, CHILDS S, LEU JP, FISHMAN MC. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 2001; **414**: 216–220.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.10.2005 r.

Przyjęto: 15.12.2005 r.

ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa

klipski@ib.amwaw.edu.pl

NATURALNE KOMÓRKI REGULATOROWE (CD4+CD25+)

NATURAL REGULATORY T CELLS (CD4+CD25+)

Magdalena CHORAŻY-MASSALSKA, Ewa KONTNY,
Włodzimierz MAŚLIŃSKI

Zakład Patofizjologii i Immunologii Instytutu Reumatologii
im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

Streszczenie: Badania prowadzone w ostatnich latach dowodzą, że komórki regulatorowe (Treg) pełnią rolę w utrzymaniu tolerancji na własne antygeny na obwodzie oraz w obronie organizmu przed chorobami autoimmunizacyjnymi. Komórki regulatorowe stanowią heterogenną subpopulację limfocytów T mających zdolność hamowania (immunosupresji) funkcji tych komórek, które w odpowiedzi immunologicznej pełnią funkcje wykonawcze (efektorowe). Wśród limfocytów Treg wyodrębnia się naturalne komórki regulatorowe (CD4+CD25+) oraz indukowane Treg (Tr1, Th3, CD4+CD25-), które nabywają zdolności immunosupresyjnych odpowiednio podczas różnicowania w grasicy lub na obwodzie. Do cząsteczek powierzchniowych występujących na komórkach Treg należą: CD25, CD45RO, CD152, GITR, LAG-3, a także niektóre cząsteczki adhezyjne, receptory dla chemokin i receptory Toll-podobne. Mechanizm immunosupresyjny naturalnych komórek CD4+CD25+ nie został dokładnie poznany, ale większość badań wskazuje, iż przynajmniej *in vitro* jest on bardziej zależny od kontaktu komórka-komórka niż od cytokin.

Słowa kluczowe: komórki regulatorowe, immunosupresja, autoimmunizacja.

Summary: Recent studies have underscored the importance of regulatory T cells (Treg) in the maintenance of immunological self-tolerance and in the prevention of autoimmune diseases. Regulatory T cells is heterogenic subpopulation of T cells, that is able to suppress functions of effector cells during the immune response. Among them are natural (CD4+CD25+) and induced Treg (Tr1, Th3, CD4+CD25-) that gain their unique phenotype during the development in the thymus or in the periphery, respectively. CD25, CD45RO, CD152, GITR, LAG-3, several adhesion molecules, chemokine receptors as well as Toll-like receptors are detected on the surface of Treg. Mechanism of suppression used by natural Treg, although not completely understood, seems to depend more on the cell-cell contact than on cytokines (at least *in vitro*).

Key words: regulatory T cells, immunosuppression, autoimmunity.

WSTĘP

W wyniku losowego powstawania na limfocytach T receptorów TCR (ang. *T cell receptors*) dla antygeny (Ag), poza limfocytami T rozpoznającymi Ag obce, powstają kłony autoreaktywne, wykazujące powinowactwo do własnych antygenów (autoAg). Choć większość z nich umiera śmiercią apoptotyczną podczas delecji klonalnej w grasicy, niektóre przedostają się na obwód, gdzie mogą stanowić zagrożenie dla stanu autotolerancji poprzez udział w patologicznej odpowiedzi autoimmunizacyjnej, prowadzącej ostatecznie do destrukcji tkanek. Jednym z mechanizmów zapewniających tolerancję na własne antygeny na obwodzie jest immunosupresja, związana z dobrze udokumentowaną obecnością wielu typów komórek regulatorowych (Treg), hamujących odpowiedź immunologiczną.

JAK ZDEFINIOWAĆ KOMÓRKĘ REGULATOROWĄ?

Komórki regulatorowe stanowią heterogenną subpopulację limfocytów T mających zdolność hamowania (immunosupresji) funkcji tych komórek, które w odpowiedzi immunologicznej pełnią funkcje wykonawcze (efektorowe). Choć istnienie komórek regulatorowych postulowano po raz pierwszy już w roku 1970, ograniczenie metod badawczych spowodowało poddanie w wątpliwość modelu immunosupresji aż do momentu identyfikacji jednej z populacji limfocytów Treg – komórek o fenotypie CD4+CD25+ [35].

Wśród limfocytów Treg wyodrębnia się nTreg – naturalne komórki regulatorowe (CD4+CD25+), które nabywają zdolności immunosupresyjnych podczas różnicowania w grasicy oraz indukowane Treg (Tr1, Th3, CD4+CD25-), które nabywają tych zdolności na obwodzie, podczas różnicowania z dziewiczych prekursorów po kontakcie z Ag.

NATURALNE KOMÓRKI REGULATOROWE CD4⁺CD25⁺ (nTreg)

Fenotyp nTreg

Badania przeprowadzone na zwierzętach wskazują, że naturalne komórki regulatorowe CD4+CD25+ (nTreg) chronią organizm przed odpowiedzią autoimmunizacyjną. Komórki te utrzymują tolerancję i homeostazę immunologiczną poprzez supresję czynnościową autoreaktywnych limfocytów T, zależną od bezpośredniego kontaktu komórka-komórka. Naturalne komórki regulatorowe (nTreg) powstają (głównie) podczas różnicowania limfocytów T w grasicy, ale również na obwodzie i stanowią około 3% wszystkich limfocytów i 5–10% obwodowych limfocytów CD4+ [3]. Komórki CD4+CD25+ zdefiniowano po raz pierwszy w 1995 roku, przeprowadzając badania na myszach nu/nu, którym podano limfocyty T pozbawione populacji CD4+CD25+ [30]. Zwierzęta te wykazywały cechy wielonarządowej choroby autoimmunizacyjnej, ustępującej po podaniu limfocytów T CD4+CD25+ od myszy zdrowych. Ponad to wykazano, iż za autoimmunizację

obserwowaną u myszy pozbawionych limfocytów T (tymektomia w 3 dniu życia) jest odpowiedzialna wyłącznie populacja CD4+CD25+ [30]. Obecność tych komórek potwierdzono także u ludzi w krwi obwodowej [11, 22], krwi pępowinowej i grasicy [36], płynach stawowych chorych na choroby reumatyczne [9], a także w węzłach chłonnych i szpiku kostnym [39].

Za pierwszy marker limfocytów Treg uznano łańcuch α receptora dla IL-2 (CD25), występujący na błonie powierzchniowej tych komórek [13]. Ze względu na umiarkowaną ekspresję CD25 na aktywowanych komórkach efektorowych (limfocyty Th1, Th2, B, DCs i Mf) niektórzy badacze za jedyną właściwą populację Treg uznają komórki z wysoką ekspresją CD25 (CD25^{hi}) [1, 12], podczas gdy inni wykazują funkcjonalność dla całej populacji CD25+ [11, 24]. nTreg mają zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych, takich jak: CD11a (LFA-1), CD44, CD54 (ICAM-1), CD103 ($\alpha_E\beta_7$ integryna) [13] oraz CD58 (LFA-3) [1], co wskazuje na „przygotowanie” do kontaktu z komórkami prezentującymi antygen (APC – ang. *antigen presenting cells*). Komórki CD4+CD25+ mają także cząsteczki świadczące o ich aktywnej migracji, mianowicie receptory dla chemokiny: CCR4, CCR8 [6, 21], CCR5 [8] oraz CXCR4 [39] i cząsteczkę CD62L odpowiedzialną za migrację limfocytów T z grasicy do węzłów chłonnych [1]. Na naturalnych Treg obecne są cząsteczki powierzchniowe świadczące o aktywacji i proliferacji: CD5 [13] oraz CD71 (receptor dla transferyny) [1]. Co więcej, na komórkach Treg wykazano obecność receptorów Toll-podobnych (TLRs) TLR4, 5, 7 i 8 [7], a także HLA-DR [1, 11, 24], które zwykle obecne są na profesjonalnych APCs.

Do markerów częściowo swoistych dla naturalnych Treg zaliczane są: CD45RO [1, 11, 24], CD152 (CTLA-4 – ang. *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) [11, 22], GITR (ang. *glucocorticoid-induced TNF receptor*) [26, 32] oraz neuropilina-1, której funkcja związana jest głównie z angiogenezą oraz z tworzeniem synapsy immunologicznej [5]. Ekspresja GITR powoduje oporność na apoptozę indukowaną przez TCR, zatem komórki Treg CD25+GITR+ mogą być odporne na selekcję negatywną w grasicy [32]. Ponieważ ekspresja większości, jeśli nie wszystkich wymienionych cząsteczek powierzchniowych zwiększa się podczas aktywacji, nie mogą być one uznane za markery Treg-specyficzne.

Jak do tej pory oznaczono dwa czynniki, których ekspresja jest specyficzna dla komórek Treg: Foxp3 [14, 19, 23] oraz wg najnowszych badań LAG-3 [20]. Foxp3 jest czynnikiem transkrypcyjnym działającym jako represor transkrypcji IL-2, a LAG-3 (CD223) to cząsteczka powierzchniowa będąca homologiem CD4, która negatywnie reguluje ekspansję limfocytów T i ich homeostazę. Ektopowa ekspresja Foxp3 [19] lub LAG-3 [20] jest wystarczająca do indukcji funkcji charakterystycznych dla Treg, choć indukowane geny różnią się w przypadku każdej z tych cząsteczek.

Supresja wywierana przez komórki CD25+ opiera się na zablokowaniu na poziomie transkrypcji produkcji IL-2 przez komórki CD25- [25]. Komórki CD4+CD25+ same nie produkują IL-2 [25], ale mają wszystkie trzy łańcuchy składające się na funkcjonalny receptor dla IL-2: IL-2R β (CD122) [1, 11, 24], IL-2R γ (CD132) [24] i IL-2R α (CD25), a ich przeżycie i ekspansja na obwodzie zależy od dostępności IL-2. Wykazano bowiem, że myszy pozbawione IL-2 lub cząsteczek, których kostymulacja jest niezbędna do produkcji tej cytokiny (CD80/86, CD28, CD40), jak również składowych IL-2R (CD25,

CD122) i cząsteczki sygnałowej IL-2 (STAT5) wykazują niedobory komórek CD4+CD25+ [25]. Pewne obserwacje wskazują, że aktywność immunosupresyjna komórek CD4+CD25+ jest zależna od sygnału przekazywanego przez łańcuch β IL-2R [16]. Wszystkie te obserwacje wskazują, że IL-2 jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania Treg. Skąd zatem pochodzi IL-2 potrzebna komórkom Treg? Głównym źródłem IL-2 są aktywowane lub autoreaktywne limfocyty T, jednak IL-2 może pochodzić także od DCs [25].

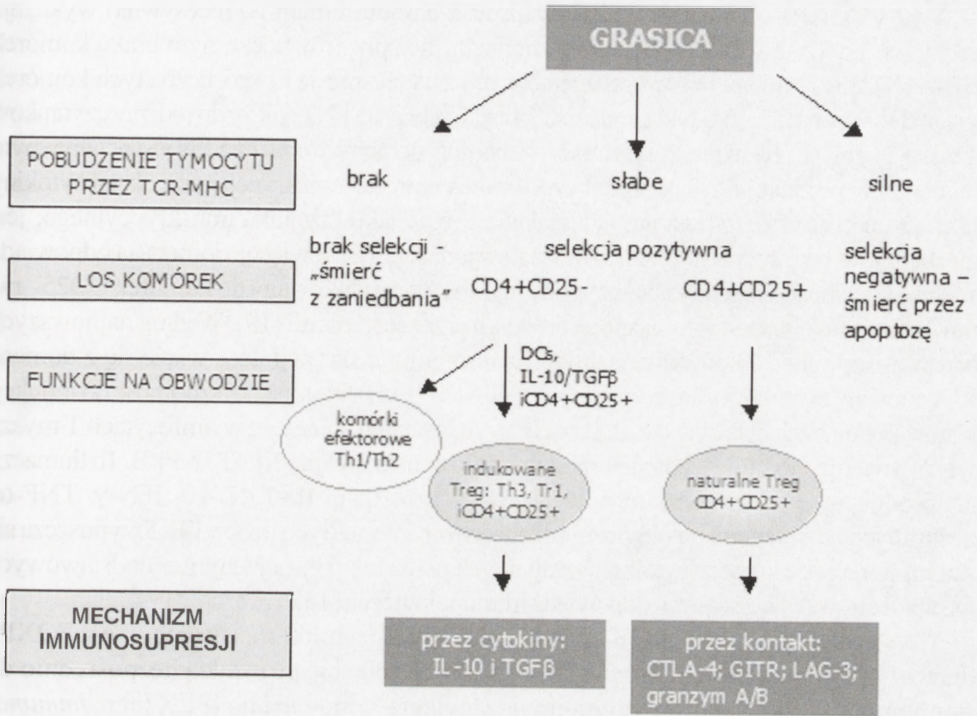
Aktywacja komórek CD4+CD25+ wymaga antygenowo swoistej stymulacji przez TCR, ale raz aktywowane nTreg wywierają efekt supresorowy w sposób antygenowo nieswoisty [31]. Fakt ten może mieć implikacje w terapii chorób autoimmunizacyjnych, w których dochodzi do rozwoju odpowiedzi na liczne autoAg, w większości niezidentyfikowane. *In vitro* aktywacja komórek CD4+CD25+ może indukować na ich powierzchni ekspresję cząsteczek, które szybko i bardzo efektywnie hamują produkcję IL-2 w komórkach efektorowych. Brak IL-2 powoduje zatrzymanie komórek efektorowych w cyklu podziałowym. Trwają badania zmierzające do identyfikacji tych cząsteczek [10]. W aktywowanych komórkach CD4+CD25+ stwierdza się podwyższony poziom mRNA dla czynników obniżających produkcję cytokin lub ich aktywność: CIS, SOCS-1/JAB, SOCS-2 i SLAP130, co może po części tłumaczyć niezdolność Treg do produkcji IL-2 [26]. Podwyższony poziom SOCS w aktywowanych CD25+ może być niezbędny do kontroli populacji CD25+ *in vivo*, tak aby została zachowana równowaga pomiędzy hamowaniem autoreaktywności a dopuszczeniem odpowiedzi na obce Ags.

Dojrzewanie komórek regulatorowych

Podczas dojrzewania tymocytów bardzo istotny dla ukierunkowania subpopulacji limfocytów T jest sygnał pochodzący z TCR. Tymocyty rozpoznają Ag w restrykcji MHC I lub MHC II i różnicują się odpowiednio w CD8+ lub CD4+. Zasada ta obowiązuje także w przypadku Treg; u zmodyfikowanych genetycznie myszy, u których nie ma rearanżacji łańcuchów TCR (*rag*^{-/-}), jak i u myszy pozbawionych genów kodujących składowe drogi przekazywania sygnału z TCR (np. I κ B, kinazy-2, Bcl-10 czy PKC- θ) powstawanie Treg jest upośledzone [15]. Alternatywny model rozwoju Treg zakłada, że ich los nie jest determinowany przez siłę interakcji TCR-ligand, lecz jest zależny od innego sygnału (np. *Notch-Notch ligand*) lub innej niż obowiązująca dla większości limfocytów T selekcji przez TCR ligand. Prawdopodobnie dopiero kombinacja tych dwóch modeli jest najbliższa rzeczywistości:

1. Sygnał z TCR o określonym powinowactwie jest niezbędny, ale niewystarczający.
2. Konieczna jest również obecność dodatkowego (niezidentyfikowanego jeszcze) sygnału.

Istnieje też możliwość, że Treg należą do tej populacji limfocytów T (30%), która wychodzi z grasicy mając nie jeden, ale dwa receptory TCR: jeden rozpoznający obce Ag (co pozwala limfocytowi T przejść selekcję w grasicy), drugi specyficzny względem własnych Ag [29]. Wiadomo, że komórki CD4+CD25+ powstają podczas różnicowania limfocytów T w grasicy i wykazują TCR o powinowactwie pośrednim lub wysokim do własnych MHC, ale nadal niższym od poziomu kwalifikującego do delecji (ryc. 1) [31].



RYCINA 1. Rozwój linii komórek regulatorowych podczas różnicowania limfocytów T w grasicy, na podstawie pracy [30]

FIGURE 1. Development of regulatory T cell lineages during T cell differentiation in the thymus, based on the paper [30]

Zgodnie z modelem proponowanym przez Rudensky'ego, Foxp3 działa jako czynnik determinujący rozwój Treg, niezależnie od restrykcji MHC czy ekspresji CD25. Nie wiadomo jeszcze, czy Foxp3 jest niezbędny tylko na etapie różnicowania, czy także na poziomie utrzymania funkcjonalności Treg [15].

Według innej hipotezy, równowaga układu immunologicznego nie opiera się wyłącznie na działaniu wyspecjalizowanych subpopulacji komórek regulatorowych, ale jest ubocznym efektem współzawodnictwa o limitowane zasoby, np. o miejsce, dostęp do receptorów MHC czy czynnika wzrostu (IL-2, IL-7), niezależnie od ich specyficzności czy funkcji efektorowych [2]. Komórki, wykazujące funkcjonalne cechy Treg, ale pozbawione markerów przypisywanych tej populacji, charakteryzują się wysoką ekspresją CD5, który jest negatywnym regulatorem przekazywania sygnału przez TCR.

Obecność większości genów związanych z autoimmunizacją raczej predysponuje do choroby, niż jest za nią bezpośrednio odpowiedzialna. Molekularne mechanizmy prowadzące do różnicowania limfocytów w Treg nie są w pełni znane, ale badania na myszach zmodyfikowanych genetycznie oraz analiza mutacji u pacjentów z uwarunkowanymi genetycznie ciężkimi zespołami chorób autoimmunizacyjnych wskazują na istotną rolę czynnika transkrypcyjnego, jakim jest Foxp3.

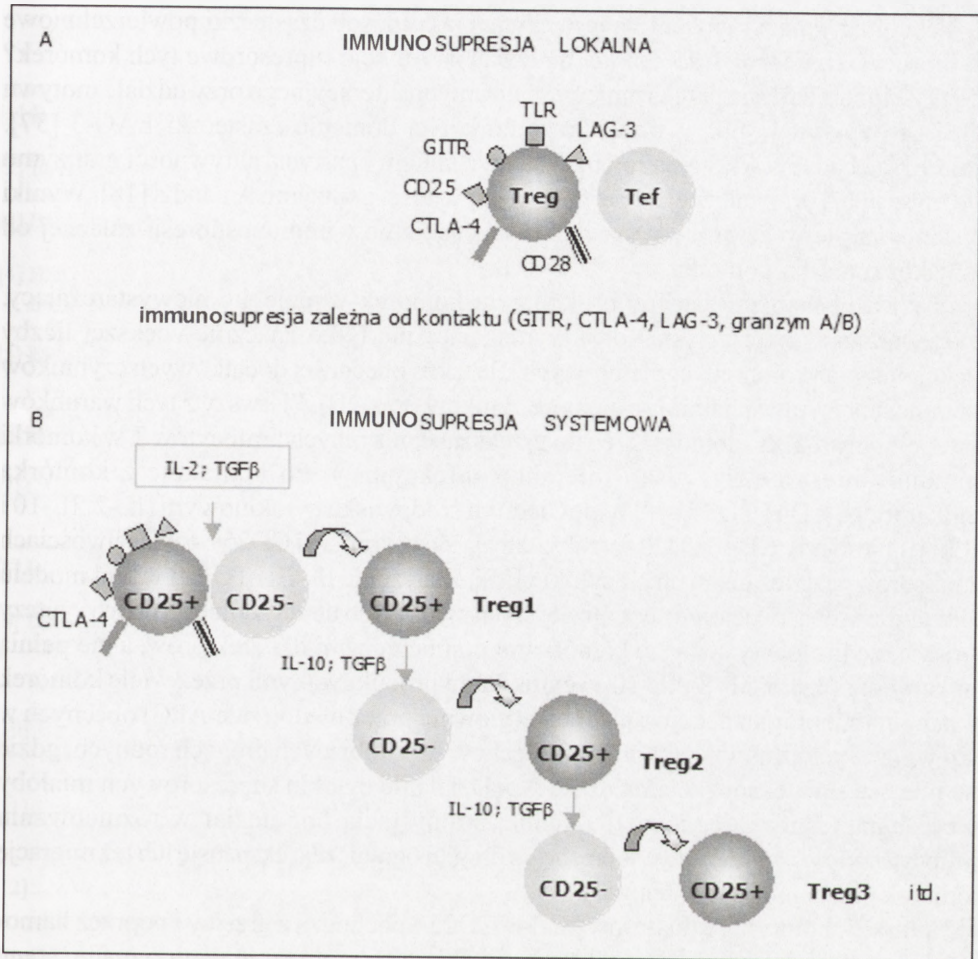
Myszy FOXP3^{-/-} (mutacja *scurfy* związana z chromosomem X, recesywna) wykazują cechy wielonarządowej choroby autoimmunizacyjnej, przy równoczesnym braku komórek CD4⁺CD25⁺. Z kolei u myszy transgenicznych z nadekspresją Foxp3 liczba tych komórek jest podwyższona [23]. Produkt genu Foxp3, białko scurfin (SFN), należy do rodziny czynników transkrypcyjnych charakteryzujących się obecnością domeny *forkhead*. SFN jest negatywnym regulatorem produkcji IL-2 poprzez bezpośrednią represję transkrypcji genu dla tej cytokiny [28]. Domena *forkhead* gwarantuje działanie Foxp3 jako czynnika transkrypcyjnego; jest niezbędna do wiązania DNA oraz lokalizacji w jądrze [27]. Co więcej, domena ta odpowiada za funkcjonalność Treg, gdyż pozbawiony jej Foxp3 transdukowany do komórek CD25⁻ nie powoduje nabycia właściwości supresorowych przez te komórki [19]. Według najnowszych badań Foxp3 nie jest konwencjonalnym represorem transkrypcji, lecz wiąże się z domeną REL innych czynników transkrypcyjnych (NFAT i NFκB), blokując ich zdolność do indukcji genów kodujących cytokiny (IL-2, IL-4, IFN-γ). Jest interesujące, że w limfocytach T myszy *scurfy* stwierdzono silnie wzmocnioną aktywność transkrypcyjną NFAT i NFκB. To tłumaczy nadprodukcję cytokin (GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IFN-γ, TNF-α) związanych ze zmianami patologicznymi obserwowanymi u tych myszy [4]. Przyпуска się zatem, że represja syntezy cytokin prozapalnych przez Foxp3 jest jednym z podstawowych mechanizmów wyłączających odpowiedź immunologiczną [15].

W ostatnich latach zidentyfikowano u ludzi dwa czynniki transkrypcyjne – FOXP3 oraz AIRE (ang. *autoimmune regulator*), których mutacje prowadzą bezpośrednio do symptomów ciężkiej choroby autoimmunizacyjnej – odpowiednio IPEX (ang. *immuno-dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) i APECED (ang. *autoimmune polyendocrinopathy*) [27]. Dotychczas zidentyfikowano 13 niezależnych mutacji w genie Foxp3 u pacjentów z IPEX, a jedyny polimorfizm zidentyfikowany w FOXP3 to ten związany z chorobą, co sugeruje, iż białko to jest wysoce konserwowane. U ludzi obserwowana jest większa „plastyczność” odpowiedzi immunologicznej, gdyż wraz z aktywacją komórek CD25⁻, dochodzi do powstania dwóch populacji komórek CD4⁺CD25⁺: efektorowych (Foxp3⁻) i regulatorowych (Foxp3⁺) [34]. Zawsze jednak Foxp3 związany jest z funkcją immunosupresyjną.

Proponowane mechanizmy działania

Komórki regulatorowe stanowią minimalny procent całej populacji, skąd więc bierze się ich skuteczność? Mechanizm supresyjny komórek CD4⁺CD25⁺ nie został dokładnie poznany, ale większość badań wskazuje, iż *in vitro* jest on bardziej zależny od kontaktu komórka-komórka [12, 22] niż od cytokin.

W wyniku lokalnej supresji zahamowana jest czynność komórek efektorowych (ryc. 2A). Podejrzewano, że za ten efekt mogą odpowiadać cząsteczki blokujące aktywację limfocytów T (takie jak CTLA-4 lub PD-1 (ang. *programmed death-1*)) bądź wydzielane miejscowo w dużych stężeniach cytokiny immunosupresyjne. Jednak ani CTLA-4, ani TGF-β czy też IL-10 nie stanowią głównego mechanizmu immunosupresji, gdyż limfocyty Treg myszy z delecją genu kodującego każdą z tych cząsteczek wykazują pełną funkcjonalność [15].



RYCINA 2. Model przedstawiający dwa rodzaje immunosupresji: lokalną, zależną od kontaktu – cząsteczek odpowiedzialnych za efekt supresorowy (A) i systemową opartą na przekształcaniu aktywowanych komórek CD25- w funkcjonalne Treg. To przekształcanie jest limitowane powtarzanym kontaktem z Ag, a zależy od kontaktu z komórkami CD4+CD25+ i obecności cytokin (IL-2, TGF-β, IL-10) (B). Treg – komórka regulatorowa, Tef – komórka efektorowa; na podstawie pracy [37]

FIGURE 2. A model suggesting two kinds of suppression: the local one, dependent on direct contact via surface molecules responsible for suppression (A), and the systemic one based on the induction of CD25- to become functionally active Treg. This type of induction is limited by repeated exposure to Ag and depends on contact with CD4+CD25+ T cells and the presence of cytokines (IL-2, TGF-β, IL-10) (B). Treg – regulatory T cell, Tef – effector T cell; based on [37]

Innym rozważanym mechanizmem immunosupresyjnym było „wychwytywanie” przez Treg czynników wzrostu dla limfocytów T (głównie IL-2) w wyniku konkurencji o limitowane zasoby [2]. Ostatnie badania wskazują jednak, że Treg hamują ekspresję IL-2 mRNA w komórkach efektorowych nawet w obecności dużych stężeń IL-2, co wyklucza działanie tego mechanizmu jako jednego z głównych [33].

Nadal intrygującym pytaniem jest, czy i w jaki sposób cząsteczki powierzchniowe na limfocytach CD4+CD25+ mogą wpływać na funkcje supresorowe tych komórek? Jedną z hipotez zakłada przekazanie sygnału antyproliferacyjnego przy udziale motywu KIEELE wykrytego np. w wewnątrzkomórkowej domenie cząsteczki LAG-3 [37]. Najnowsze badania wskazują również na mechanizm oparty na aktywności granzymu B u myszy [17] oraz zależnej od perforyny aktywności granzymu A u ludzi [18]. Wyniki te stanowią pierwsze próby wyjaśnienia mechanizmów immunosupresji zależnej od kontaktu komórka-komórka.

In vivo mechanizm zależny od kontaktu komórek wydaje się niewystarczający. Potrzebna jest supresja systemowa wymagająca nie tylko znacznie większej liczby funkcjonalnych komórek regulatorowych, ale także obecności dodatkowych czynników immunosupresyjnych, jakimi są niektóre cytokiny (ryc. 2B). Pierwszy z tych warunków jest spełniony dzięki zdolności Treg do przekształcania innych limfocytów T w komórki immunosupresyjne (zjawisko tolerancji infekcyjnej). Po kontakcie z komórką regulatorową CD4+CD25+ i w odpowiednim środowisku cytokinowym (IL-2, IL-10 i TGF- β) limfocyty CD4+CD25- przekształcają się w komórki CD25+ o właściwościach supresorowych niezależnych od cytokin [38]. Znaczenie IL-10 i TGF- β w tym modelu potwierdzają obserwacje, że neutralizacja tych cytokin lub utrata zdolności do ich syntezy sprawia, że limfocyty stają się komórkami pomocniczymi dla efektorów, a nie pełnią funkcji Treg [38]. TGF- β i IL-10 są cytokinami produkowanymi przez wiele komórek układu immunologicznego wrodzonego (głównie przez niedojrzałe APC) obecnych w przewodzie pokarmowym, układzie oddechowym i kobiecych drogach rodnych, gdzie ma miejsce stała ekspozycja na różne Ag. Działanie cytokin supresorowych miałoby więc charakter dwubiegunowy: z jednej strony mają one udział w różnicowaniu limfocytów T w czynnościowe supresory, z drugiej ograniczają ekspansję lub też migrację komórek potencjalnie patogennych.

Naturalne komórki regulatorowe CD4+CD25+ pochodzą z grasicy i poprzez hamowanie populacji komórek autoreaktywnych pełnią centralną rolę w utrzymaniu stanu tolerancji na obwodzie. Poza oczywistymi korzystnymi efektami działania Treg dla gospodarza (obrona przed autoimmunizacją, indukcja tolerancji na przeszczepy), istnieją także mniej korzystne – jak np. hamowanie odpowiedzi antynowotworowej. Ze względu na ambiwalentne efekty działania Treg, komórki te wymagają szczegółowych badań głównie pod kątem ewentualnego wykorzystania w terapii. W świetle dotychczasowych danych można przypuszczać, że komórki CD4+CD25+ wykorzystują różne mechanizmy działania (kontakt/cytokiny) w zależności od mikrośrodowiska i stymulacji. Należy jednak pamiętać, że szlaki immunosupresji badane na mysich modelach (badania *in vivo*, *in vitro*) mogą wykazywać znaczne różnice względem tych, występujących u człowieka (badania *in vitro*) [24].

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAECHEER-ALLAN C, BROWN JA, FREEMAN GJ, HAFLER DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; **167**: 1245–1253.
- [2] BARTHLOTT T, KASSIOTIS G, STOCKINGER B. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med* 2003; **197**: 451–460.
- [3] BERTHELOT JM, MAUGARS Y. Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases (including rheumatoid arthritis). Facts and hypotheses. *Joint Bone Spine* 2004; **71**: 374–380.
- [4] BETTELLI E, DASTRANGE M, OUKKA M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 5138–5143.
- [5] BRUDER D, PROBST-KEPPER M, WESTENDORF AM, GEFFERS R, BEISSERT S, LOSER K, VON BOEHMER H, BUER J, HANSEN W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 623–630.
- [6] BYSTRY RS, ALUVIHARE V, WELCH KA, KALLIKOURDIS M, BETZ AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001; **2**: 1126–1132.
- [7] CARAMALHO I, LOPES-CARVALHO T, OSTLER D, ZELENAY S, HAURY M, DEMENGEOT J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003; **197**: 403–411.
- [8] D'AMBROSIO D, SINIGAGLIA F, ADORINI L. Special attractions for suppressor T cells. *Trends Immunol* 2003; **24**: 122–126.
- [9] DE KLEER IM, WEDDERBURN LR, TAAMS LS, PATEL A, VARSANI H, KLEIN M, DE JAGER W, PUGAYUNG G, GIANNONI F, RIJKERS G, ALBANI S, KUIS W, PRAKKEN B. CD4+CD25 bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004; **172**: 6435–6443.
- [10] DIECKMANN D, BRUETT CH, PLOETTNER H, LUTZ MB, SCHULER G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 2002; **196**: 247–253.
- [11] DIECKMANN D, PLOTTNER H, BERCHTOLD S, BERGER T, SCHULER G. *Ex vivo* isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; **193**: 1303–1310.
- [12] EHRENSTEIN MR, EVANS JG, SINGH A, MOORE S, WARNES G, ISENBERG DA, MAURI C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004; **200**: 277–285.
- [13] FEHERVARI Z, SAKAGUCHI S. A paragon of self-tolerance: CD25+CD4+ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**: 19–25.
- [14] FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 330–336.
- [15] FONTENOT JD, RUDENSKY AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; **6**: 331–337.
- [16] FURTADO GC, CUROTTO DE LAFAILLE MA, KUTCHUKHIDZE N, LAFAILLE JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 2002; **196**: 851–857.
- [17] GONDEK DC, LU LF, QUEZADA SA, SAKAGUCHI S, NOELLE RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005; **174**: 1783–1786.
- [18] GROSSMAN WJ, VERBSKY JW, BARCHET W, COLONNA M, ATKINSON JP, LEY TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004; **21**: 589–601.
- [19] HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299**: 1057–1061.
- [20] HUANG CT, WORKMAN CJ, FLIES D, PAN X, MARSON AL, ZHOU G, HIPKISS EL, RAVI S, KO-WALSKI J, LEVITSKY HI, POWELL JD, PARDOLL DM, DRAKE CG, VIGNALI DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; **21**: 503–513.

- [21] IELLEM A, MARIANI M, LANG R, RECALDE H, PANINA-BORDIGNON P, SINIGAGLIA F, D'AMBROSIO D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001; **194**: 847–853.
- [22] JONULEIT H, SCHMITT E, STASSEN M, TUETTENBERG A, KNOP J, ENK AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; **193**: 1285–1294.
- [23] KHATTRI R, COX T, YASAYKO SA, RAMSDELL F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 337–342.
- [24] LEVINGS MK, SANGREGORIO R, RONCAROLO MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of function. *J Exp Med* 2001; **193**: 1295–1302.
- [25] MALEK TR, BAYER AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 665–674.
- [26] MCHUGH RS, WHITTERS MJ, PICCIRILLO CA, YOUNG DA, SHEVACH EM, COLLINS M, BYRNE MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; **16**: 311–323.
- [27] RAMSDELL F, ZIEGLER SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**: 718–724.
- [28] SCHUBERT LA, JEFFERY E, ZHANG Y, RAMSDELL F, ZIEGLER SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37672–37679.
- [29] SCHWARTZ RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005; **6**: 327–330.
- [30] SHEVACH EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 2001; **193**: F41–46.
- [31] SHEVACH EM. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 2721–2724.
- [32] SHIMIZU J, YAMAZAKI S, TAKAHASHI T, ISHIDA Y, SAKAGUCHI S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; **3**: 135–142.
- [33] THORNTON AM, DONOVAN EE, PICCIRILLO CA, SHEVACH EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the *in vitro* activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 2004; **172**: 6519–6523.
- [34] WALKER MR, KASPROWICZ DJ, GERSUK VH, BENARD A, VAN LANDEGHEM M, BUCKNER JH, ZIEGLER SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1437–1443.
- [35] WICKELGREN I. Immunology. Policing the immune system. *Science* 2004; **306**: 596–599.
- [36] WING K, EKMARK A, KARLSSON H, RUDIN A, SURI-PAYER E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002; **106**: 190–199.
- [37] WORKMAN CJ, DUGGER KJ, VIGNALI DA. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J Immunol* 2002; **169**: 5392–5395.
- [38] ZHENG SG, WANG JH, GRAY JD, SOUCIER H, HORWITZ DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004; **172**: 5213–5221.
- [39] ZOU L, BARNETT B, SAFAH H, LARUSSA VF, EVDEMON-HOGAN M, MOTTRAM P, WEI S, DAVID O, CURIEL TJ, ZOU W. Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 2004; **64**: 8451–8455.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 13.10.2005 r.

Przyjęto: 03.01. 2006 r.

ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa,

e-mail: MChorazy@ir.ids.pl

CZY MITOCHONDRIA INDUKUJĄ PROGRAMOWANĄ ŚMIERĆ KOMÓRKI W ROŚLINACH?

DO MITOCHONDRIA INDUCE PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANTS?

Joanna KOZIOŁ-LIPIŃSKA, Ewa SIMEONOVA, Agnieszka MOSTOWSKA

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin,
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: W artykule przedstawiony został aktualny stan badań dotyczących roli mitochondriów w procesie programowanej śmierci komórki (PCD) roślin. Od dawna sugerowano, że roślinne mitochondria, podobnie jak zwierzęce, mogą indukować PCD. Dotychczasowe badania wskazują, że trudno jednoznacznie określić podobieństwo mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję oraz przebieg PCD w świecie zwierząt i roślin. Mitochondria roślinne zaangażowane są w proces PCD w odmienny sposób niż mitochondria zwierzęce w apoptozie. Proces starzenia się organów, tkanek i komórek roślinnych, który angażuje mechanizmy PCD, jest bowiem związany z redystrybucją metabolitów syntetyzowanych i magazynowanych podczas cyklu życiowego rośliny. Dotąd nie wiadomo, czy podczas PCD w mitochondriach roślinnych zawsze zachodzi zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (MPT) oraz załamanie się potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$). Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów roślinnych do cytozolu zarejestrowano w systemie *cell-free*. Rola cytochromu c oraz jego funkcja indukująca PCD w roślinach mogą sugerować wspólne ścieżki apoptozy zwierząt i PCD roślin. Dotychczasowe informacje dotyczące indukcji PCD podczas różnicowania się komórek w cyklu życiowym roślin nie wyjaśniają w pełni roli mitochondriów w tym procesie.

Słowa kluczowe: mitochondria roślinne, programowana śmierć komórki, potencjał transbłonowy mitochondriów.

Summary: In this paper current knowledge concerning the role of mitochondria in plant programmed cell death (PCD) is presented. It has been already suggested that plant mitochondria, similarly to animal ones, can induce PCD. Senescence process in plants which engages PCD mechanisms involves transport and redistribution of metabolites what require energy generated in mitochondria. It seems therefore that PCD in plants might proceed in different way than animal apoptosis. It is still not clear whether mitochondrial permeability transition (MPT) and decrease of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) always take place in plants. Release of cytochrome c into cytosol and its inducible role in PCD in *cell-free* system in plants may suggest the existence of some common pathways of animal apoptosis and plant PCD. In spite of many results concerning induction of PCD during differentiation process, existing data do not elucidate the role of mitochondria in this process.

Key words: plant mitochondria, programmed cell death, mitochondrial membrane potential.

1. WPROWADZENIE

Od dawna wiadomo, że mitochondria odgrywają kluczową rolę w apoptozie u zwierząt [36,38]. Wykazano między innymi, że w izolowanych jądrach bez ekstraktu zawierającego mitochondria apoptoza nie zachodzi, podczas gdy komórki bez jąder są zdolne do rozpoczęcia apoptozy [91]. Wykazano również, że pierwszymi symptomami apoptozy w większości analizowanych ludzkich i zwierzęcych komórkach apoptotycznych są zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (MPT) i zmiana potencjału transbłonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$) [38]. Depolaryzacja błony mitochondrialnej przy wysokim stężeniu Ca^{2+} w cytozolu może prowadzić do otwarcia megakanałów, czyli porów w błonie mitochondrialnej (PTP), następnie powodować napływ wody do matriks, pęcznienie mitochondriów i w konsekwencji rozerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej białkowych czynników indukujących apoptozę: cytochromu c, czynnika AIF i prokaspaz [69,70].

Od końca lat dziewięćdziesiątych XX w. sugerowano, że roślinne mitochondria, podobnie jak zwierzęce, mogą być zaangażowane w programowaną śmierć komórki (PCD), a nawet indukować PCD [4,40]. Proces PCD w roślinach jest od dość dawna przedmiotem licznych badań [37,77]. Wiadomo, że w trakcie przebiegu wielu procesów w cyklu życiowym rośliny zachodzi PCD i bezpośrednio poprzedza śmierć wybranej grupy komórek, określonych organów lub całych organizmów [48]. Ma to miejsce między innymi w przypadku starzenia się liści [67], tapetum [5,49] podczas procesu ksylogenezy [86], a także podczas superczułej odpowiedzi (HR) na atak patogena [41]. Indukcja tych procesów oraz ich prawidłowy przebieg wymaga ekspresji szeregu specyficznych genów tzw. *senescence associated genes* (SAGs) [13,33,58]. PCD może być także indukowana różnymi stresami i czynnikami środowiskowymi [9,13,30,37,45,59]. Znanymi wyznacznikami PCD w komórkach roślinnych, podobnie jak w przypadku apoptozy u zwierząt jest kondensacja chromatyny na terenie jądra, a także nieprzypadkowa internukleosomalna fragmentacja jądrowego DNA (nDNA) [8,23,37,-48,49,59,67]. Chociaż do tej pory nie znaleziono homologów kaspaz zwierzęcych w roślinach, to jednak w genomie *Arabidopsis* zlokalizowano geny kaspazo-podobnych białek [76] oraz stwierdzono obecność kaspazo-podobnych proteaz cysteinowych (CLP), których aktywność jest indukowana podczas PCD [10,81].

Mimo że nie znaleziono także strukturalnych homologów białek z rodziny BCL-2, takich jak BAX i BCL-2, które modulują funkcje kaspaz zwierzęcych, to znaleziono roślinny homolog inhibitora-1 białka BAX – BI-1 [65], który prawdopodobnie funkcjonuje jako kluczowy i powszechny (u zwierząt i u roślin) regulator szlaku śmierci [80].

Przedmiotem licznych badań jest obecnie analiza zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów i powiązanie tego zjawiska z PCD [22,47,50,68]. O ile rola mitochondriów w apoptozie u zwierząt, a w szczególności uwolnienie cytochromu c, została wykazana ponad wszelką wątpliwość, o tyle w PCD roślin wymaga dalszych badań. Wśród badaczy mechanizmów PCD w roślinach toczy się szeroka dyskusja, czy system sygnałowy indukcji PCD jest uniwersalny w świecie roślin i zwierząt, a szczególnie czy mitochondria w komórkach roślinnych są zaangażowane w przekazywanie sygnałów pro-apoptotycznych, tak jak to ma miejsce podczas apoptozy w komórkach zwierzęcych i ludzkich.

2. ROLA MITOCHONDRIÓW W AKTYWACJI MECHANIZMÓW PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ

2.1. Rola mitochondriów w indukcji apoptozy w komórkach zwierzęcych

Doniesienia z ostatnich lat dotyczące apoptozy w komórkach zwierzęcych wskazują na mitochondria jako ośrodki integracji oraz przekazywania sygnałów o indukcji apoptozy [28,36,38,40,47]. Ostatnio rozważana jest rola mitochondriów w indukowaniu PCD w drożdżach [62]. Wyniki dotychczasowych badań pozwoliły na stwierdzenie, iż jednym z pierwszych przejawów apoptozy w komórkach zwierzęcych i ludzkich w większości przypadków jest zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (MPT) [11,34,88] oraz redukcja potencjału transbłonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$) [1,36,38,87,88]. Wykazano, iż spadek $\Delta\Psi_m$ jest przyczyną nieodwracalności przebiegu apoptozy *in vivo* oraz *in vitro* [87,88]. W następstwie spadku $\Delta\Psi_m$ zachodzi rozprężenie procesu transportu elektronów i syntezy ATP, co generuje znaczące ilości reaktywnych form tlenu (ROS) w komórce [39,57,66,87], a następnie powoduje peroksydację komponentów wewnętrznej błony mitochondrialnej, co w konsekwencji prowadzi do nieodwracalnych zmian w jej strukturze [87]. Wykazano, że zarówno cyklosporyna (CsA) – inhibitor ssaków PT [11], jak i antyutleniacze, które wymiatają aniony nadtlenkowe [79], mogą hamować MPT, co nie zawsze jest związane ze zmianą $\Delta\Psi_m$.

Udział mitochondriów w apoptozie został potwierdzony wówczas, gdy wykazano, że białka mitochondrialne zarówno pro-, jak i anti-apoptotyczne z rodziny BCL-2, tj. czynnik indukujący apoptozę (AIF) oraz cytochrom c, uczestniczą w fazie końcowej apoptozy (*execution phase*) [78]. W warunkach stresu następują zmiany pH w komórce, a także zmiany poziomu niektórych metabolitów – ATP, ADP, NADH, NADPH oraz fosforanu kreatyny, dochodzi do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} i wzrostu stężenia ROS, co indukuje otwarcie porów w błonie mitochondrialnej (PTP) i spadek $\Delta\Psi_m$ [34,36,38,-88]. W konsekwencji, wskutek napływu wody do matryks, mitochondria pęcznieją, rozerwana zostaje błona zewnętrzna oraz z przestrzeni międzybłonowej uwolnione zostają do cytozolu białkowe czynniki pro-apoptotyczne: cytochrom c, AIF oraz prokaspazy 2, 3, 9 [2,28,32,35,71]. Wolny cytochrom c wiąże się, w obecności dATP, z czynnikiem Apaf-1 i pro-kaspazą 9, dzięki czemu aktywacji ulega kaspaza 9. Wyzwała to kaskadę aktywności kolejnych kaspaz – proteaz cysteinowych będących głównym składnikiem mechanizmów regulujących apoptozę. Uwolniony z mitochondriów do cytoplazmy cytochrom c stanowi kluczowy element systemu sygnałowego indukcji programowanej śmierci związanej z działaniem kaskady kaspaz. Natomiast czynnik AIF uwolniony z mitochondriów jest transportowany do jądra, gdzie zaangażowany jest w aktywację procesu fragmentacji nDNA [4,23].

2.2. Metody badania potencjału transbłonowego mitochondriów

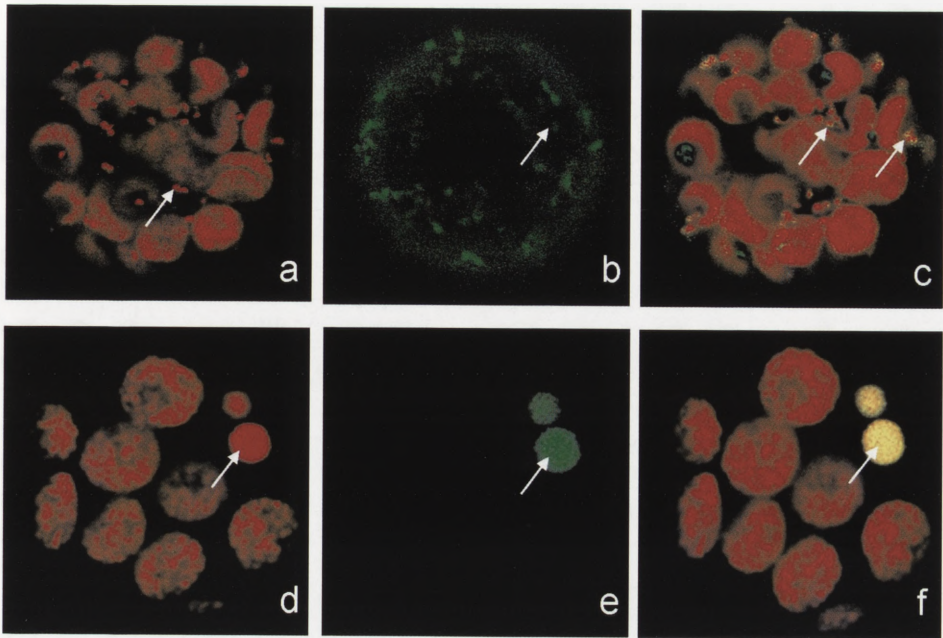
Jak przedstawiono powyżej, redukcja potencjału błonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$) jest jednym z pierwszych przejawów PCD w komórkach ludzkich i zwierzęcych.

Pierwsze metody pomiaru $\Delta\Psi_m$ prowadzonego *in vitro* polegały na oznaczaniu gradientów stężenia jonów potasu K^+ lub radioaktywnych jonów rubidu $^{86}Rb^+$ w poprzek błony mitochondrialnej, po zastosowaniu walinomycyny (ruchomego nośnika, czyli jonoforu, katalizującego elektryczny uniport $^{86}Rb^+$ oraz K^+); [29]. W innych metodach monitorowania zmian wartości $\Delta\Psi_m$ wykorzystuje się dyfuzję lipofilnych cząsteczek do komórki i ich akumulację w matryks mitochondrialnej, np. kationu tetrafenylofosfoniowego (TPP^+) [20,29]. Do fluorochromów powszechnie stosowanych do analizy $\Delta\Psi_m$ należą: rodamina 123 (Rh 123), tetrametylorodamina (TMR), ester metylowy tetrametylorodaminy (TMRM), ester etylowy tetrametylorodaminy (TMRE), safranina O, jodek 3,3'-diheksylokarbocyaniny ($DiOC_6(3)$) oraz oranż nonylakrydyny (NAO) [29,31,54,60,85]. W metodzie fluorescencyjnej umożliwiającej analizę kinetyki zmian potencjału transbłonowego mitochondriów jest wykorzystywane zjawisko fluorescencji rezonansowego przeniesienia energii (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). Metoda FRET oparta jest na interakcji pary fluorochromów, takich jak: NAO i TMR lub TMRM i fluorochrom MitoTracker Green [12,29], co pozwala na dokładne śledzenie zmian $\Delta\Psi_m$, oraz ich precyzyjną lokalizację, na przykład umożliwia obserwację redukcji $\Delta\Psi_m$ w pojedynczych mitochondriach w danej komórce [12].

Do analizy zmian $\Delta\Psi_m$ w ludzkich i zwierzęcych komórkach apoptotycznych zastosowano również sondę fluorescencyjną typu: jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny, JC-1 [1,29,87,88]. Lipofilne kationy JC-1 specyficznie wnikają do mitochondriów, akumulując się w ujemnie naładowanej matryks mitochondrialnej w formie J-monomerów i J-agregatów. Formowanie się J-agregatów jest uwarunkowane powstawaniem wysoce ujemnego potencjału transbłonowego w mitochondrium o wartościach $\Delta\Psi_m$ bardziej ujemnych niż 140 mV [63,72]. J-agregaty w mitochondriach o wysoce ujemnym potencjale transbłonowym fluoryzują na czerwono. Monomery JC-1 wykazują zieloną fluorescencję wskazując na depolaryzację błony mitochondrialnej o wartościach dodatnich potencjału do -100 mV [63,72]. Redukcja potencjału, a tym samym depolaryzacja błony powoduje zanik czerwonej fluorescencji. Zielona fluorescencja monomerów może być nadal obserwowana, gdyż depolaryzacja błony nie powoduje całkowitego uwolnienia monomerów fluorochromu z mitochondriów [63,72]. Badania fluorometryczne $\Delta\Psi_m$ przy zastosowaniu fluorochromu JC-1 były prowadzone w komórkach zwierzęcych i ludzkich oraz w mitochondriach w warunkach *in vitro* stosując mikroskop fluorescencyjny i laserowy skaningowy mikroskop konfokalny oraz spektrofluorymetr i cytometr przepływowy [20,63,72]. Ostatnio zastosowano badania fluorometryczne po raz pierwszy do monitorowania $\Delta\Psi_m$ w mitochondriach roślinnych [68].

2.3. Rola mitochondriów w indukcji programowanej śmierci komórki w roślinach

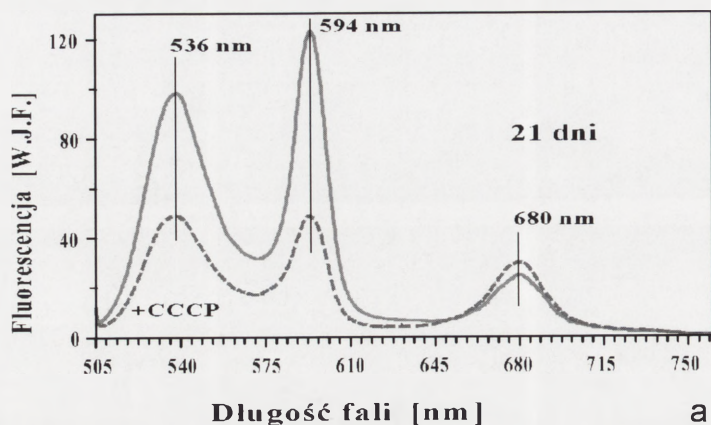
Jak wynika z przedstawionych powyżej danych, istnieje szereg doniesień o zaangażowaniu mitochondriów w mechanizmy regulujące indukcję programowanej śmierci w komórkach zwierzęcych i ludzkich. Ostatnie lata przyniosły pierwsze wyniki badań dotyczących roli mitochondriów podczas starzenia się i programowanej śmierci w komórkach roślinnych [22,40,46,47,68]. Mitochondria roślinne były poddane analizie $\Delta\Psi_m$ przy użyciu safraniny O oraz rodaminy 123, a także fluorochromu MitoTracker Orange [22,31,60] i fluorochromu JC-1, który specyficznie akumuluje się w mitochondriach roślinnych (ryc. 1 i 2) [68].



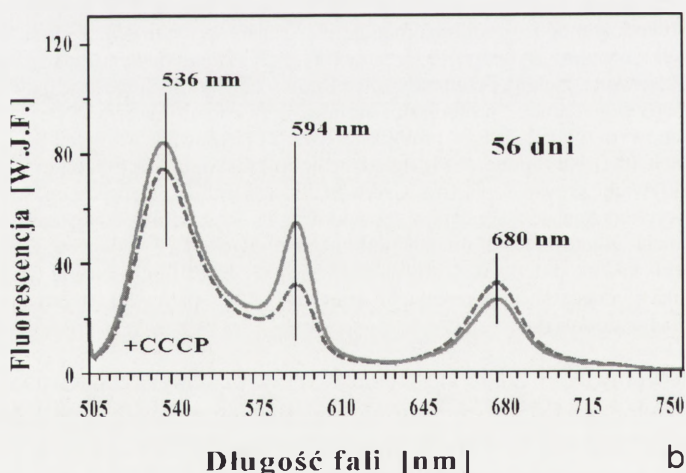
RYCINA 1a-c. Protoplasty mezofilu izolowane z zielonych liści 21-dniowych siewek *Pisum sativum* (a-c) barwione JC-1, oglądane w mikroskopie konfokalnym. Liczne mitochondria (strzałki) równomiernie rozmieszczone w cytoplazmie. Czerwona fluorescencja mitochondriów (strzałki) wynika z wytworzenia się J-agregatów spowodowanego wysokim potencjałem transbłonowym (a), zielona fluorescencja mitochondriów (strzałki) wynika z wytworzenia się monomerów JC-1 spowodowanego niskim potencjałem transbłonowym (b), czerwona, zielona i pomarańczowa fluorescencja mitochondriów (strzałki) wynika z kolokalizacji, wewnątrz tego samego protoplastu, zarówno mitochondriów z wysokim jak i z niskim potencjałem transbłonowym (c); ryc. 1 d-f – protoplasty mezofilu izolowane z żółtych liści 56-dniowych siewek *Pisum sativum* (d-f) barwione JC-1, oglądane w mikroskopie konfokalnym. „Gigantyczne” mitochondria (strzałki) widoczne w cytoplazmie. Czerwona fluorescencja „gigantycznego” mitochondrium (strzałki) wynika z wytworzenia się J-agregatów spowodowanego wysokim potencjałem transbłonowym (d), zielona fluorescencja „gigantycznego” mitochondrium (strzałki) wynika z wytworzenia się monomerów JC-1 spowodowanego niskim potencjałem transbłonowym (e), żółta fluorescencja „gigantycznego” mitochondrium wynika z jednoczesnej fluorescencji J-agregatów i monomerów JC-1 wewnątrz tego samego „gigantycznego” mitochondrium (f)

Dzięki zastosowaniu JC-1 udało się wykazać, że w protoplastach zarówno izolowanych z młodych, zielonych liści *Pisum sativum*, jak i ze starzejących się żółtych liści tego gatunku występują jednocześnie dwie subpopulacje mitochondriów różniących się wartościami $\Delta\Psi_m$ (ryc.1 i 2) [68]. Obok mitochondriów wykazujących czerwoną fluorescencję J-agregatów świadczącą o zachowaniu wysoce ujemnego potencjału transbłonowego, w tej samej komórce obserwowano pulę mitochondriów wykazujących zieloną fluorescencję monomerów JC-1, świadczącą o redukcji $\Delta\Psi_m$ do wartości większej od -100 mV [63]. Jak wynika z analizy fluorescencyjnej $\Delta\Psi_m$ przeprowadzonej w mikroskopie konfokalnym, a także w spektrofлуorymetrze, w starzejących się komórkach mezofilu obserwuje się wciąż pulę mitochondriów o wysoce ujemnym potencjale transbłonowym (ryc.1 i 2). Dodanie protonoforu – karbonylocyjanu-3-chlorofenylhydrazonu (CCCP), odpowiedzialnego za zniesienie gradientu elektrochemicznego

**Fluorescencja JC-1 w mitochondriach
komórek mezofilu 21-dniowego *Pisum sativum***



**Fluorescencja JC-1 w mitochondriach
komórek mezofilu 56-dniowego *Pisum sativum***



RYCINA 2a,b. Widma emisji fluorescencji monomerów JC-1 (maks. 536 nm), J-agregatów (maks. 594 nm) i chlorofilu (maks. 680 nm), zarejestrowane przy wzbudzeniu falą o długości 490 nm, w zawieszynie protoplastów mezofilu, izolowanych z liści *Pisum sativum* 21-dniowych (a) i 56-dniowych (b) roślin. Wraz z zaawansowaniem starzenia się roślin, odnotowano spadek intensywności fluorescencji J-agregatów (a,b) i w mniejszym stopniu monomerów JC-1(a,b) akumulowanych w mitochondriach protoplastów mezofilu, wyrażonej we względnych jednostkach fluorescencji. Dodanie do zawiesziny protoplastów CCCP powodowało wygaszenie zarówno fluorescencji J-agregatów, jak również monomerów JC-1

mitochondriów, powodowało wygaszanie głównie czerwonej fluorescencji J-agregatów (ryc. 2) [68]. CCCP przemieszczając się wahadłowo przez błonę może katalizować elektryczny uniport protonów i zwiększać przewodnictwo protonowe błony, co powoduje zmniejszenie siły protonomotorycznej Δp i potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ nawet do zera [56]. Wynik ten jest zgodny z danymi dotyczącymi zmiany $\Delta\Psi_m$ w zwierzęcych i ludzkich mitochondriach [63,72]. W protoplastach starzejących się roślin obserwowano zgrupowania mitochondriów, wśród których jedno mitochondria wykazywały w mikroskopie konfokalnym czerwoną, a inne zieloną fluorescencję JC-1 świadczącą o różnicowaniu wartości $\Delta\Psi_m$ [68]. Podobne zgrupowania mitochondriów o czerwonej i zielonej fluorescencji obserwowali także Leśniewska i wsp. [50] podczas PCD komórek tapetum pylnikowego u *Ornithogalum virens*. W jeszcze starszych liściach *Pisum sativum* zidentyfikowano ogromne mitochondria o średnicy około 2 μm pochodzące być może z fuzji drobnych mitochondriów (ryc. 1d-f) [68]. Te gigantyczne mitochondria wykazywały zarówno zieloną, jak też czerwoną fluorescencję JC-1, co dowodzi istnienia lokalnych różnic w wartości potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w różnych obszarach błony pojedynczego mitochondrium [81]. Podobne różnice stwierdzono również na poziomie pojedynczego organellum w wielu typach komórek zwierzęcych [63,72].

Reasumując, analiza $\Delta\Psi_m$ podczas starzenia się mezofilu *Pisum sativum* przy użyciu JC-1, wykazała, iż zapoczątkowanie PCD w tym procesie nie jest sprzężone z redukcją wysoce ujemnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$ ok. -180 mV) we wszystkich mitochondriach danej komórki [68], jak to ma miejsce w większości zbadanych przypadków apoptozy w komórkach zwierzęcych czy ludzkich [1,36,87]. Na podstawie tych wyników trudno więc jednoznacznie stwierdzić, czy mitochondria są ośrodkiem przekazywania pierwszych sygnałów pro-apoptotycznych podczas PCD komórek mezofilu.

Istnieje szereg doniesień dotyczących roli mitochondriów roślinnych podczas PCD indukowanej różnymi czynnikami chemicznymi w kulturach roślin *in vitro* lub w układach eksperymentalnych, tzw. *cell free systems* [89,90,91]. Stwierdzono np., że wiktoryna, produkowana przez pasożytniczego grzyba *Cochliobolus victoriae*, może indukować PCD w genotypach owsa wrażliwych na wiktorynę. W tym przypadku pierwszym przejawem PCD *in vivo* jest redukcja $\Delta\Psi_m$ [22]. Izolowane z młodych liści owsa mitochondria, po inkubacji z wiktoryną, wykazują znaczącą zmianę MPT, której w określonych warunkach może towarzyszyć uwolnienie cytochromu c do płynu inkubacyjnego [22]. W przypadku PCD indukowanej witaminą K₃ (2-metylanoftochinon-1,4) w kulturze protoplastów *Nicotiana tabacum* L. oraz podczas PCD indukowanej wysoką temperaturą w odciętych liścieniach *Cucumis sativus* L. dochodzi do translokacji cytochromu c do cytoplazmy, co powoduje aktywację kaspazo-podobnych białek (CLP) [4,40]. W komórkach kukurydzy, w których indukowano PCD poprzez dodanie D-mannozy również stwierdzono uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy [40,73]. W systemie *cell-free*, cytochrom c z cytozolu marchwi indukował PCD przejawiającą się kondensacją chromatyny i fragmentacją nDNA [89,90,91]. Wyniki tych eksperymentów jednoznacznie dowodzą zaangażowania cytochromu c w regulację PCD, indukowanej w warunkach *in vitro*, a także wskazują na kluczową rolę cytochromu c w aktywacji CLP, odpowiedzialnych za uruchomienie fragmentacji jądrowego DNA oraz degradację lamin jądrowych [40,91].

W innych badaniach podczas naturalnej lub indukowanej PCD często rejestrowano uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, chociaż nie zawsze był to wystarczający czynnik do indukcji PCD. Podczas dojrzewania elementów naczyniowych *Zinnia elegans*, zarejestrowano depolaryzację wewnętrzną błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c z mitochondriów, ale uwolnienie cytochromu c nie było wystarczające do indukcji PCD [86]. Podobnie w protoplastach *Arabidopsis* zmiana $\Delta\Psi_m$, którą rejestrowano przed typową dla PCD kondensacją chromatyny, poprzedzała wypływ cytochromu c, ale uwalnianie cytochromu c nie było także w tym przypadku konieczne do indukcji PCD [85]. W przypadku mitochondrialnego mutantu słonecznika, charakteryzującego się męską sterylnością, mitochondria w komórkach tapetum uwalniały cytochrom c do cytoplazmy, co rejestrowano wcześniej niż fragmentację nDNA i kondensację chromatyny [5]. Xu i Hanson [84] wykazali natomiast, iż podczas procesu starzenia się płatków kwiatowych *Petunia inflata*, który niewątpliwie angażuje mechanizmy PCD, we wczesnych etapach tego procesu nie zachodzi uwalnianie cytochromu c z błon mitochondriów.

W mitochondriach izolowanych z korzeni pszenicy i z bulw ziemniaka poddanych stresowi anoksji i wysokiemu stężeniu jonów Ca^{2+} [31,78], zarejestrowano otwarcie PTP i w konsekwencji pęcznienie tych organelli; procesy te, u obu gatunków, nie były wrażliwe na CsA – inhibitor ssaczych PTP [1]. Natomiast niski poziom jonów Ca^{2+} w cytoplazmie hamował PCD w komórkach *Arabidopsis* [52]. W przypadku mitochondriów pszenicy zarejestrowano wypływ cytochromu c, który nie był hamowany przez CsA [78]. Wrażliwość wyżej wymienionych procesów na CsA u innych gatunków wykazali natomiast Yu i wsp. [86], Tiwari i wsp. [75] i Arpagaus i wsp. [3]. Według Tiwari i wsp. [75] PCD indukowana H_2O_2 wymagała u *Arabidopsis* tworzenie się ROS prowadzące do otwarcia PTP oraz uwolnienia cytochromu c, co powodowało ostatecznie śmierć komórek. Uwolnienie cytochromu c i śmierć komórek hamował inhibitor proteazy serynowo/cysteinowej, chociaż dodanie tego inhibitora jedynie częściowo hamowało otwarcie MTP [75]. Zarówno H_2O_2 , jak i NO indukowały PCD w zawiesinie komórek soi [15]; autorzy rejestrowali spadek $\Delta\Psi_m$, zmniejszenie zużycia tlenu, uszkodzenie zewnętrznej błony mitochondrialnej i wypływ cytochromu c z mitochondriów [15]. Zastosowanie protonoforu – karbonylocyjanu-p-trifluorometoksyhydrazonu (FCCP) powodowało spadek $\Delta\Psi_m$, natomiast dodanie CsA – wzrost $\Delta\Psi_m$. Wzrost $\Delta\Psi_m$ spowodowany był bezpośrednio napływem jonów K^+ do mitochondriów i objawiał się pęcznieniem tych organelli [15,17,60,61]. Według wyżej wymienionych grup autorów mitochondria mają K^+ -selektywne kanały, regulowane przez stan redoks i otwierane przez CsA [60]. Mitochondrialne kanały K^+_{ATP} są, jak wynika z ostatnich doniesień, zaangażowane w PCD indukowaną H_2O_2 lub NO [15]. Tak więc pęcznienie mitochondriów i uwalnianie cytochromu c związane jest z aktywnością różnych porów/kanałów, PTP i K^+_{ATP} , które w odmienny sposób mogą być modulowane przez CsA [61].

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, cytochrom c uwalniany z mitochondriów zwierzęcych jest głównym czynnikiem uruchamiającym kaskadę kaspaz, a następnie procesy proteolityczne. W komórkach roślinnych wykryto aktywność proteaz cysteinowych [82] podobnych do kaspaz zwierzęcych. Te kaspazo-podobne białka (CLP)

zlokalizowano w niektórych roślinnych tkankach, np. w *Arabidopsis* [64], w tytoniu podczas PCD indukowanej działaniem patogena [18,26] i w kulturach pomidora podczas PCD-indukowanej chemicznie [19,24], a także podczas starzenia się drugorzędowych pędów grochu [10].

Ostatnie badania wykazały w roślinach obecność następujących typów proteaz cysteinowych: metakaspaz. np. VEIDazy, asparaginylo-specyficznych proteaz cysteinowych (ang. *legumains*), np. YVADazy, proteaz należących do enzymów VPE (ang. *vacuolar processing enzyme*) i proteaz serynowych podobnych do subtilizyny, np. szapazy. Wszystkie one mają strukturę podobną do zwierzęcych kaspaz, a także prawdopodobnie w podobny sposób zaangażowane są w PCD [82]. Roślinne CLP nie są blokowane przez te same inhibitory co zwierzęce kaspazy, co może wskazywać na to, że PCD u roślin, podobnie jak apoptoza u zwierząt, jest regulowana zarówno przez CLP, jak również przez inne proteazy [82].

W roślinach wykryto także receptoro-podobne białka R wykazujące podobieństwo strukturalne do czynnika Apaf-1. Białka R kodowane są przez rodzinę genów ulegających ekspresji podczas infekcji indukowanej przez patogena. Białka R zawierają domenę N-terminalną przypominającą receptor Toll/interleukina 1 (TIR) *Drosophila* i ssaków [47].

Istnieją doniesienia potwierdzające zaangażowanie w regulację PCD roślin białek będących funkcjonalnymi odpowiednikami białek z rodziny BCL-2 [47]. Jak wiadomo, białka BCL-2 oraz BAX w komórkach ssaków, stanowią kluczowy element systemu regulującego apoptozę, przebiegającą z udziałem mitochondriów zaangażowanych w przekazywanie sygnałów indukcji PCD. W komórkach drożdży oraz w komórkach roślinnych nie stwierdzono występowania genów kodujących białka BCL2 i BAX. Wiadomo jednak, iż ekspresja genu *BAX* w komórkach drożdży oraz w komórkach tytoniu wywołuje PCD [44], a dodanie białka BAX do zawiesiny mitochondriów tytoniu powoduje uwolnienie cytochromu c [40,44,47].

W 1998 roku Reed i współpracownicy [83] wyizolowali z komórek drożdży białko BI-1 (ang. *Bax inhibitor-1*) będące inhibitorem białka BAX [23]. Homologi BI-1 znaleziono w komórkach *Arabidopsis* i ryżu. Homologi BI-1 roślin mogą funkcjonować jako czynniki anty-apoptotyczne i prawdopodobnie wchodzi w interakcję lub modulują aktywność białek, które w roślinach odpowiadają funkcjonalnie białkom BCL-2 oraz BAX ssaków [16,42,47,65]. Wyizolowane z *Arabidopsis* białko AtBI-1 wykazuje największe podobieństwo do BI-1 ssaków. Oba zidentyfikowane roślinne homologi BI-1 wprowadzone do komórek drożdży blokowały PCD indukowaną białkiem BAX [42,47,65]. Innym roślinnym białkiem wykazującym właściwość blokowania PCD indukowanej przez BAX w komórkach drożdży jest S-transferaza/peroksydaza glutationowa zidentyfikowana u pomidora [46,47]. Ekspresja genu dla tej transferazy prowadzi do utrzymania określonego poziomu glutationu, niezbędnego do zachowania $\Delta\Psi_m$. W obecności białka S-transferazy/peroksydazy glutationowej odnotowano większą odporność komórek drożdży na stres oksydacyjny wywołany przez ROS. Uważa się bowiem, że indukcja PCD u drożdży przez białko BAX odbywa się poprzez ROS, których źródłem są mitochondria [51]. W przypadku PCD, mitochondrialne PTP stanowiłyby sensory stresu komórkowego,

odpowiedzialne za uwolnienie do cytoplazmy czynników indukcji PCD. Hipoteza ta ma szczególne znaczenie w zrozumieniu mechanizmów zaangażowanych w regulację PCD roślin związanej z HR. Wiadomo bowiem, iż odpowiedź obronna rośliny podczas patogenezы bazuje na wytworzeniu określonego poziomu ROS w komórkach. Stwierdzono także, iż krótkotrwały stres oksydacyjny może indukować śmierć komórek *Arabidopsis* w kulturze *in vitro*. Stres oksydacyjny wzmacnia transport elektronów, co intensyfikuje produkcję H₂O₂ [53,75] oraz powoduje obniżenie poziomu ATP. Zwiększona zawartość H₂O₂ powoduje zmianę przepuszczalności błon mitochondriów i uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy [53,55,75].

Wykazano, że tlenek azotu, jako potencjalna cząsteczka sygnałowa, może we współdziałaniu z hormonami i ROS, powodować otwarcie PTP, a tym samym indukować PCD [14,21,25,27,40]. W konsekwencji może nastąpić uwolnienie cytochromu c i innych czynników pro-apoptycznych.

Niedawno, dzięki zastosowaniu tzw. *cell-free* systemu, który zawierał oczyszczone jądra *Arabidopsis* oraz mitochondria i/lub ekstrakt cytozolu, w przestrzeni międzybłonowej zidentyfikowano Mg²⁺-zależną nukleazę, podobną do mitochondrialnej endonukleazy G, indukującą kondensację chromatyny i fragmentację nDNA [6,48].

Analiza białek mitochondrialnych w zawiesinie starzejących się komórek *Arabidopsis* lub komórek poddanych PCD indukowanej stresem wysokiej temperatury wykazała wyraźny wzrost poziomu 11 białek mitochondrialnych, głównie antyoksydacyjnych, co wskazuje na duże znaczenie mitochondriów w procesie PCD [74]. Sugerowane jest również zaangażowanie pewnych glikoprotein w przekazywanie „sygnału śmierci” z komórki do komórki [74]. Ostatnio również zidentyfikowano w mitochondriach roślinnych białka związane z tioredoksyną, które prawdopodobnie regulują potencjał redoks w mitochondriach [7,66]. Zakłócenie funkcji proteasomów, które są zaangażowane w regulację zwierzęcej apoptozy, prowadzi, jak wykazali Kim i wsp. [43], do PCD komórek roślinnych.

3. PODSUMOWANIE

Przedstawiony powyżej przegląd wyników badań dotyczących zaangażowania mitochondriów podczas różnych wariantów PCD w komórkach roślinnych wskazuje, że trudno jednoznacznie określić podobieństwo mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję oraz przebieg PCD w świecie zwierząt i roślin. Mitochondria roślinne zaangażowane są w proces PCD w odmienny sposób niż mitochondria zwierzęce w apoptozie, w efekcie której powstają ciała apoptotyczne usuwane przez wyspecjalizowane komórki żerne czy makrofagi. Proces starzenia się organów, tkanek i komórek roślinnych, który angażuje mechanizmy PCD, jest bowiem związany z redystrybucją metabolitów syntetyzowanych i magazynowanych podczas cyklu życiowego rośliny [13]. Procesy związane z transportem i redystrybucją metabolitów wymagają dostarczenia energii, która jest generowana w mitochondriach.

Rola mitochondriów w indukcji PCD, zachodzącej jako jeden z etapów rozwojowych w cyklu życiowym rośliny, nadal pozostaje niewyjaśniona. Dane, dotyczące zmiany MPT, redukcji $\Delta\Psi_m$ i uwolnienia cytochromu c, odnoszą się głównie do PCD w komórkach roślinnych poddanych działaniu różnego typu stresów lub infekcji przez patogena. Cytochrom c, którego uwalnianie z mitochondriów oraz jego efekt indukujący PCD stwierdzono w systemie *cell-free* może sugerować pewne wspólne ścieżki apoptozy zwierząt i PCD u roślin.

Natomiast nieliczne informacje dotyczące indukcji PCD podczas różnicowania się komórek w cyklu życiowym roślin nie wyjaśniają w pełni roli mitochondriów w tym procesie.

LITERATURA

- [1] ANKARCRONA M, DYPBUKT JM, ORRENIUS S, NICOTERA P. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Letters* 1996; **394**: 321–324.
- [2] ANNIS MG, SOUCE EL, DLUGOSZ PJ, CRUZ-AGUADO JA, PENN LZ, LEBER B, ANDREWS DW. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 2005; **24**(12): 2096–2103.
- [3] ARPAGAUS S, RAWYLER A, BRAENDLE R. Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J Biol Chem* 2002; **227**: 1780–1787.
- [4] BALK J, LEAVER CJ, McCABE PF. Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Letters* 1999; **463**: 151–154.
- [5] BALK J, LEAVER C. The *pet1-cms* mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 2001; **13**: 1803–1818.
- [6] BALK J, CHEW SK, LEAVER CJ, McCABE PF. The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J* 2003; **34**: 573–583.
- [7] BALMER Y, VENSEL WH, TANAKA CK, HURKMAN WJ, GELHAYE E, ROUHIER N, JACQUOT J-P, MANIERI W, SCHURMANN P, DROUX M, BUCHANAN BB. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2642–2647.
- [8] BEERS EP. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ* 1997; **4**: 649–661.
- [9] BEERS EP, McDOWELL JM. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 561–567.
- [10] BELENGHI B, SALOMON M, LEVINE A. Caspase-like activity in seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. *J Exp Bot* 2004; **55**(398): 889–897.
- [11] BERNARDI P, PETRONILLI V, DI LISA F, FORTE M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 112–117.
- [12] BRADY NR, ELMORE SP, VAN BEEK H, WESTERHOFF. Spatiotemporal coordination of membrane potential between rabbit ventricular cardiomyocyte mitochondria. *J Exp Med* 2000; **192**: 1001.
- [13] BUCHANAN-WOLLASTON V, MORRIS K. Senescence and cell death in *Brassica napus* and *Arabidopsis*. [w:] Bryant JA, Hughes SG, Garland JM [red.] Programmed cell death in animals and plants. Oxford: BIOS Scientific Publishers 2000: 149–162.
- [14] CAPONE R, TIWARI BS, LEVINE A. Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 2004; **42**: 425–428.
- [15] CASOLO V, PETRUSSA E, KRAJŇÁKOVÁ J, MACRÍ F, VIANELLO A. Involvement of the mitochondrial K^+_{ATP} channel in H_2O_2 - or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *J Exp Bot* 2005; **56**(413): 997–1006.
- [16] CHAE H-J, KEN, KIM H-R, CHEN S, GODZIK A, DICKMAN M, REED JC. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologues from animals, plants, and yeast. *Gene* 2003; **323**: 101–113.
- [17] CHIANDUSSI E, PETRUSSA E, MARCI F, VIANELLO A. Modulation of a plant mitochondrial K^+_{ATP} channel and its involvement in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* 2002; **34**: 177–184.

- [18] CHICHKOVA NV, KIM SH, TITOVA ES, KALKUM M, MOROZOV VS, RUBTISOV YP, KALININA NO, TALIANSKY ME, VARTAPETIAN AB. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* 2004; **16**(1): 157–171.
- [19] CLARKE A, DESIKAN R, HURST RD, HANCOCK JT, NEILL SJ. NO way back: nitric oxid and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 2000; **24**: 667–677.
- [20] COSSARIZZA A, SAVIOLI S, FRANCESCHI C. Analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) with fluorescent probes. *Post Biol Kom* 1997; **24**(4): 575–585.
- [21] CRAWFORD NM, GUO F-Q. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* 2005; **10**(4): 195–200.
- [22] CURTIS M, WOLPERT TJ. The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant J* 2002; **29**(3): 295–312.
- [23] DANON A, DELORME V, MAILHAC N, GALLOIS P. Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**: 647–655.
- [24] DE JONG AJ, HOEBERICHTS FA, YAKIMOVA ET, MAXIMOVA E, WOLTERING EJ. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 2000; **211**: 656–662.
- [25] DE STEFANO M, FERRARINI A, DELLEDONNE M. Nitric oxide functions in the plant hypersensitive disease resistance response. *BMC Plant Biol* 2005; **5**(1): 10.
- [26] DEL POZO O, LAM E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* 1998; **8**: 1129–1132.
- [27] DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998; **394**: 585–588.
- [28] DESAGHER S, MARTINOU JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 369–377.
- [29] DYKENS JA, STOUT AK. Assessment of mitochondrial membrane potential *in situ* using single potentiometric dyes and novel fluorescence resonance energy transfer technique. *Meth Cell Biol* 2001; **65**: 285–309.
- [30] ESTELLE M. Proteases and cellular regulation in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 254–260.
- [31] FORTES F, CASTILHO RF, CATISTI R, CARNIERI EGS, VERCESI A. Ca^{2+} induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 2001; **33**(1): 43–51.
- [32] GABRIEL B, SUREAU F, CASSELYN M, TEISSIE J, PETIT PX. Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c-induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL. *Exp Cell Res* 2003; **289**(2): 195–210.
- [33] GAN S, AMASINO RM. Making sense of senescence. *Plant Physiol* 1997; **113**: 313–319.
- [34] GARCÍA N, ZAZUETA C, PAVÓN N CHÁVEZ E. Agaric acid induces mitochondrial permeability transition through its interaction with the adenine nucleotide translocase. Its dependence on membrane fluidity. *Mitochondrion* 2005; **5**: 272–281.
- [35] GOLDSTEIN JC, MUNOZ-PINEDO C, RICCI JE, ADAMS SR, KELEKAR A, SCHULER M, TSIEN RY, GREEK DR. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ* 2005; **12**(5): 453–462.
- [36] GRĄDZKA I. Apoptoza: decyzyja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 2000; **46**(1): 2–16.
- [37] GREENBERG JT. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12094–12097.
- [38] HALESTRAP AP, GILLESPIE JP, O'TOOLE A, DORAN E. Mitochondria and cell death: a pore way to die? [w] Bryant JA, Hughes SG, Garland JM [red.] Programmed cell death in animals and plants. Oxford: BIOS Scientific Publishers 2000: 149–162.
- [39] JAMES AM, COCHEME HM, MURPHY MP. Mitochondria-targeted redox probes as tools in the study of oxidative damage and ageing. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**(9): 982–986.
- [40] JONES AM. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci* 2000; **5**(5): 225–230.
- [41] JONES AM. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 2001; **125**: 94–97.
- [42] KAWAI M, PAN L, REED J.C, UCHIMIVA H. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett* 1999; **464**: 143–147.
- [43] KIM M, AHN J-W, JIN U-H, CHOI D, PAEK K-H, PAI H-S. Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *J Biol Chem* 2003; **278**(21): 19406–19415.
- [44] LACOMME C, SANTA CRUZ S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7956–7961.

- [45] LAM E, PONTIER D, DELL POZO O. BAXing in the hypersensitive response. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 419–421.
- [46] LAM E, DEL POZO O. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* 2000; **44**: 417–428.
- [47] LAM E, KATO N, LAWTON M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 2001; **411**: 848–853.
- [48] LAM E. Controlled cell death, plant survival and development. *Plant Cell Biol* 2004; **5**: 305–315.
- [49] LEŚNIEWSKA J, SIMEONOVA E, SIKORA A, MOSTOWSKA A, CHARZYŃSKA M. Application of comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants. *Acta Soc Bot Pol* 2000; **69**: 101–107.
- [50] LEŚNIEWSKA J, SIMEONOVA E, CHARZYŃSKA M. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential in anther tapetum. *Sex Plant Reprod* 2004; **16**: 283–288.
- [51] LEVINE A, BELENGHI B, DAMARI-WEISLER H, GRANOT D. Vesicle-associated membrane protein of *Arabidopsis* suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. *J Biol Chem* 2001; **276**(49): 46284–46289.
- [52] LI J, WANG D-Y, LI Q, XU Y-J, CUI K-M, ZHU Y-X. PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea and transgenic *Arabidopsis* plants possibly by delaying cytosolic Ca²⁺ elevation. *Cell Calcium* 2004; **35**: 71–77.
- [53] MAZEL A, LEVINE A. Induction of cell death in *Arabidopsis* by superoxide in combination with salicylic acid or with protein synthesis inhibitors. *Free Rad Biol Med* 2001; **30**(1): 98–106.
- [54] MEDINA JM, LÓPEZ-MEDIAVILLA C, ORFAO A. Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. *FEBS Letters* 2002; **510**: 127–132.
- [55] MILLAR H, CONSIDINE MJ, DAY DA, WHELAN J. Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. *IUBMB Life* 2001; **51**: 201–205.
- [56] NICHOLLS DG, FERGUSON SJ. Bioenergetyka 2. tłum. Lilla Hryniewiecka. Wydaw. Nauk., PWN, Warszawa 1995.
- [57] NOHL H, GILLE L, STANIEK K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2005; **69**: 719–723.
- [58] NOODÉN LD, GUIAMÉT JJ, JOHN I. Senescence mechanisms. *Physiol Plant* 1997; **101**: 746–753.
- [59] PENNEL RI, LAMB C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 1997; **9**: 1157–1168.
- [60] PETRUSSA E, CASOLO V, BRAIDOT E, CHIANDUSSI E, MACRI F, VIANELLO A. Cyclosporin A induces the opening of a potassium-selective channel in higher plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2001; **33**(2): 107–117.
- [61] PETRUSSA E, CASOLO V, PERESSON C, BRAIDOT E, VIANELLO A, MACRI F. The K⁺_{ATP} channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria. *Mitochondrion* 2004; **3**: 297–307.
- [62] POZNIAKOVSKY AI, KNORRE DA, MARKOWA OV, HYMAN AA, SKULACHEV VP, SEVERIN FU. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 2005; **17**(168): 257–269.
- [63] REERS M, SMILEY ST, MOTTOLA-HARTSHORN C, CHEN A, LIN M, CHEN L. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1. *Methods Enzymol* 1995; **260**: 406–417.
- [64] SAFADI F, MYKLES DL, REDDY ASN. Partial purification and characterization of a Ca²⁺-dependent proteinase from *Arabidopsis* root. *Arch Biochem Biophys* 1997; **348**: 143–151.
- [65] SANCHEZ P, DE TORRES ZEBALA M, GRANT M. AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J* 2000; **21**: 393–399.
- [66] SCHOLZ-STARKE J, GAMBALE F, CARPANETO A. Modulation of plant ion channels by oxidizing and reducing agents. *Arch Biochem Biophys* 2005; **434**: 43–50.
- [67] SIMEONOVA E, SIKORA A, MOSTOWSKA A, CHARZYŃSKA M. Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* 2000; **214**: 93–101.
- [68] SIMEONOVA E, GARSTKA M, KOZIOŁ-LIPIŃSKA J, MOSTOWSKA A. Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma* 2004; **223**: 143–153.
- [69] SKULACHEV VP. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". *IUBMB Life* 2000a; **49**: 365–373.
- [70] SKULACHEV VP. How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? *Free Radic Med* 2000b; **29**(10): 1056–1059.

- [71] SMAILI SS, HSU Y-T, YUOLE RJ, RUSSELL JT. Mitochondria in Ca²⁺ signalling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 2000; **32**: 35–46.
- [72] SMILEY ST, REERS M, MOTTOLA-HARTSHORN C, LIN M, CHEN A, SMITH TW, STEEL GD, CHEN L. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3671–3675.
- [73] STEIN JC, HANSEN G. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol* 1999; **121**: 71–79.
- [74] SWIDZINSKI JA, LEAVER CJ, SWEETLOVE LJ. A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* 2004; **65**: 1829–1838.
- [75] TIWARI BS, BELENGHI B, LEVINE A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol* 2002; **128**: 1271–1281.
- [76] UREN AG, O'ROURKE K, ARAVIND L, PISABARRO MT, SESHGIRI S, KOONIN EV, DIXIT VM. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000; **6**: 961–967.
- [77] VAN DOORN WG, WOLTERING EJ. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* 2005; **10**(3): 117–122.
- [78] VIROLAINEN E, BLOKHINA O, FAGERSTEDT K. Ca²⁺-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Ann Bot* 2002; **90**: 509–516.
- [79] WANG X-J, WANG Z-B, XU J-X. Effect of salivianic acid A on lipid peroxidation and membrane permeability in mitochondria. *J Ethnopharmacol* 2005; **97**: 441–445.
- [80] WATANABE N, LAM E. Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Mol Plant Pathol* 2004; **5**: 65–70.
- [81] WOLTERING EJ, VAN DER BENT A, HOEBERICHTS FA. Do plant caspases exist? *Plant Physiol* 2002; **130**: 1764–1769.
- [82] WOLTERING E. Death proteases come alive. *Trends Plant Sci* 2004; **9**(10): 469–472.
- [83] XU Q, REED JC. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1998; **1**: 337–346.
- [84] XU Y, HANSON MR. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in *Petunia*. *Plant Physiol* 2000; **122**: 1323–1333.
- [85] YAO N, EISFELDER BJ, MARVIN J, GREENBERG JT. The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2004; **40**: 596–610.
- [86] YU X-H, PERDUE TD, HEIMER YM, JONES AM. Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Diff* 2002; **9**: 189–198.
- [87] ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, ZANIM C, DECAUDIN D, MACHO A, HIRSCH T, SUSIN SA, PETIT PX, MIGNOTTE B, KROEMER G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; **182**: 367–377.
- [88] ZAMZAMI N, SUSIN SA, MARCHETTI P, HIRCH T, GÓMEZ-MONTERREY I, CASTEDO M, KROEMER G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; **183**: 1533–1544.
- [89] ZHAO Y, JIANG Z, SUN Y, ZHAI Z. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters* 1999a; **448**: 197–200.
- [90] ZHAO Y, SUN Y, JIANG Z, ZHAI Z. Apoptosis carrot nuclei in *in vitro* system induced by cytochrome c. *Chin Sci Bull* 1999b; **44**(16): 1497.
- [91] ZHAO Y, WU M, SHEN Y, ZHAI Z. Analysis of nuclear apoptotic process in a cell-free system. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 298–306.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 13.09.2005 r.

Przyjęto: 02.01.2006 r.

ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa,

e-mail: mostowag@biol.uw.edu.pl

ROLA ŚRÓDBŁONKA W TRAKCIE ROZWOJU ORAZ DOJRZEWANIA TKANEK I NARZĄDÓW

THE ROLE OF ENDOTHELIUM IN DEVELOPMENT, TISSUES
AND ORGANS FORMATION

Kamil Marek LIPSKI¹, Kazimierz OSTROWSKI², Janusz KOMENDER¹,
Dariusz ŚLADOWSKI¹

¹Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek, ²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie: Śródbłonek przestał już być uważany jedynie za warstwę komórek oddzielającą światło naczyń od tkanek je otaczających. Zaczęto dostrzegać jego znaczenie w różnych procesach biologicznych. W pracy tej przedstawiono dwustronną zależność między naczyniami a otaczającymi je komórkami w rozwoju organizmu, tworzeniu się i dojrzewaniu różnych tkanek i organów.

Słowa kluczowe: śródbłonek, rozwój, dojrzewanie tkanek i narządów.

Summary: Endothelium is not only a layer of cells separating lumen of vessel from surrounding tissues. It begins to notice its role in many biological processes. This paper presents the role of endothelium and vessels in development, tissues and organs formation and maturation.

Key words: endothelium, development, tissues and organs maturation.

Wzajemna interakcja pomiędzy otaczającymi tkankami a komórkami śródbłonna jest jednym z podstawowych procesów odpowiedzialnym za różnicowanie oraz prawidłowe funkcje organów ludzkiego ciała.

Najważniejszym czynnikiem wpływającym na angiogenezę jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń – VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Pierwsze wzmianki o istnieniu substancji stymulującej angiogenezę pojawiły się w 1948 roku, po badaniach Michaelsona nad powstawaniem naczyń siatkówki. W latach osiemdziesiątych, po wyizolowaniu jej przez Sengera i wsp. z tkanek nowotworowych w 1983 roku, substancja ta znana była jako czynnik przepuszczalności naczyń – VPF (*vascular permeability factor*) – ze względu na rozszczelnienie śródbłonna występujące po zadziałaniu nim na naczynia. Natomiast za datę odkrycia funkcji angiogenetycznych

VPF oraz nadania mu obecnej nazwy przyjmuje się rok 1989 (badania prowadzone w laboratoriach Uniwersytetu San Francisco i firmy Genentech).

VEGF jest wydzielany przez liczne komórki, m.in. przez włókna obwodowych nerwów czuciowych w skórze płodu, pęcherzyki płucne czy poddane działaniu hipoksji astrocyty w czasie tworzenia się naczyń siatkówki. Receptory dla niego znajdują się głównie na komórkach śródbłonna. Stanowi on czynnik torujący dla tworzących się naczyń [4].

Poza VEGF, który jest ogólnoustrojowym czynnikiem angiogenetycznym, istnieją także tkankowo-specyficzne czynniki wzrostu, takie jak np. EG-VEGF (*endocrine gland VEGF*) wydzielany tylko przez gruczoły produkujące hormony sterydowe (np. kora nadnerczy) oraz działający proliferacyjnie głównie na naczynia tych narządów (ale nie na śródbłonek aorty, naczyń pępowinowych czy skóry). Być może zostaną wkrótce odkryte także czynniki specyficzne dla innych narządów [13].

Wydzielany przez śródbłonek płytkowy czynnik wzrostu – PDGF (*platelet-derived growth factor*) pobudza, przez swoje receptory (znajdujące się m.in. na powierzchni komórek mięśni gładkich) rekrutację, migrację oraz proliferację komórek budujących ścianę naczynia. Kolejną substancją odpowiedzialną za formowanie się ściany naczyń jest angiopoetyna – Ang-1, działająca na komórki śródbłonna – ECs przez receptor kinazy tyrozynowej Tie-2, a wydzielana przez otaczające tkanki. Aktywacja tego szlaku powoduje wydzielanie przez śródbłonek parakrynych czynników, rekrutujących komórki mięśniówki gładkiej oraz prekursorzy pericytów [5, 10, 29].

TKANKA NERWOWA

Przykładem wzajemnego oddziaływania śródbłonna i tkanki nerwowej mogą być doświadczenia z przeszczepianiem tkanki mózgowej z naczyńiami do innych tkanek oraz naczyń obwodowych do mózgu. W pierwszym przypadku zmniejszała się liczba połączeń ścisłych między komórkami śródbłonna – ECs (*endothelial cells*) oraz zwiększała przepuszczalność naczyń, w drugim – nabierały charakteru naczyń mózgowych (obwódki zamykające – *occludens* i przylegania – *adherens* między komórkami śródbłonna, ciągła i dobrze rozwinięta błona podstawna) wraz z wytworzeniem bariery krew-mózg [27].

We wspólnej hodowli astrocytów oraz ECs pochodzących z naczyń mózgowych, te pierwsze układają się w sieć wydłużonych, wielokomórkowych kolumn oraz wykazują zwiększoną Ca^{2+} -odpowiedź na bradykininę i kwas glutaminowy [32].

Sygnaly ze śródbłonna powodują, poza proliferacją astrocytów i różnicowaniem się ich prekursorów (zwłaszcza dzięki czynnikowi hamującemu białaczkę – LIF), także przemieszczenie błonowej akwaporyny-4 oraz zwiększenie wydzielania lamininy-5.

Białko morfogenetyczne kości – BMP-2 (*bone morphogenetic protein*), produkowane m.in. przez aortę, oraz TGF- β 1 mogą zmieniać los neuronalnych komórek macierzystych. BMP-2 przyspiesza ich różnicowanie w kierunku neuronów, natomiast TGF promuje rozwój SMCs. Również w dojrzałym hipokampie istnieje współdziałanie śródbłonna oraz neuronów. W miejscach podziału naczyń oraz na końcach kapilar istnieją konglomeraty neuroblastów, gleju i angioblastów, mogące być źródłem nowych neuronów w dorosłym organizmie [23].

Wydaje się, że czynniki wydzielane przez ECs, jak np. mózgowy czynnik neurotroficzny – BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), są konieczne do przeżycia, migracji, wzrostu oraz dojrzewania neuronów. Wytwarzanie BDNF przez śródbłonek stymulowane jest przez VEGF (przez receptor VEGFR2(Flk-1)).

Nerwy i naczynia pokonują często te same szlaki w trakcie embriogenezy. Przykładem mogą być kończyny, w których tętnice i nerwy tworzą wspólne pęczki zaopatrujące mięśnie i kości. Spowodowane jest to prawdopodobnie wykorzystywaniem przez oba te układy wspólnych mechanizmów przekąźnikowych, składających się z semaforyn i VEGF oraz receptorów dla nich – neurofilin, występujących na komórkach śródbłonka i aksonach neuronów [2, 21].

SIATKÓWKA

W trakcie rozwoju embrionalnego, pierwszą siecią naczyń siatkówki są te wychodzące ze szczytu nerwu wzrokowego i rozpostarte na wewnętrznej powierzchni tej części oka. Towarzyszy im bliźniacza sieć astrocytów pochodzących również z tego nerwu – uważa się, że naczynia podążają za powstającymi wypustkami komórek glejowych. Po wytworzeniu się pierwotnej, jednopoziomowej sieci, naczynia zaczynają wnikać głębiej w siatkówkę, aż do wewnętrznej warstwy spłotowatej, formując drugą, równoległą sieć naczyniową (niezależną od astrocytów). Pierwotna sieć powstaje w mechanizmie waskulogenezy (formowanie się naczyń *de novo* z komórek prekursorowych, migrujących i różnicujących w komórki śródbłonka), natomiast wtórna – angiogenezy (powstawanie nowych naczyń w wyniku rozrastania się istniejącej sieci naczyniowej). Dowodem na występowanie waskulogenezy w siatkówce jest obecność komórek o fenotypie angioblastów [7].

Ważną rolę w rozwoju siatkówki odgrywa VEGF. Poza śródbłonkiem, receptory dla tego czynnika wzrostu (a szczególnie VEGFR-1(Flt-1)) znajdują się na komórkach glejowych oraz komórkach barwnikowych siatkówki. Połączenie VEGF z receptorem powoduje migrację tych komórek (bez proliferacji). VEGF wydzielany jest zarówno przez astrocyty, jak i komórki śródbłonka – jest to więc zarówno oddziaływanie autokrynne, jak i parakrynne. [25]

Brak właściwej kontroli procesów formowania się naczyń w siatkówce może prowadzić do wielu schorzeń, takich jak: retinopatia cukrzycowa, starcze zwyrodnienie plamki, retinopatia wcześniaków.

TKANKA TŁUSZCZOWA

Naczynia mają także wpływ na tkankę tłuszczową. *In vivo*, w rozwoju embrionalnym, komórki tłuszczowe układają się wokół sieci naczyń i dalszy ich wzrost uzależniony jest od jej rozbudowy. Również macierz zewnątrzkomórkowa naczyń wpływa na proliferację i różnicowanie adipocytów, a śródbłonek naczyń tkanki tłuszczowej podskórnej i sieci (ale nie naczyń skóry) wydzielają czynniki parakrynne stymulujące ich wzrost [30, 11].

ANGIOGENEZA W PROCESIE KOŚCIOTWORZENIA

Dosyć dobrze poznane jest wzajemne oddziaływanie chrząstki i kości z naczyniami (zwłaszcza podczas osteogenezy na podłożu chrzęstnym). Prawidłowa, spoczynkowa chrząstka wydziela silne czynniki antyangiogenetyczne i w związku z tym pozbawiona jest naczyń. Jednak w początkowym okresie osteogenezy, kiedy następuje proliferacja chondrocytów, występuje również zwiększenie ekspresji czynników wzrostu naczyń w chondrocytach. W chrząstkę zaczynają wnikać naczynia, chondrocyty wchodzi w apoptozę, a na ich miejsce zaczynają migrować osteoblasty i osteoklasty [8].

Eksperymenty ze wspólną hodowlą chondrocytów i komórek śródbłonka wykazały, że te ostatnie wydzielają czynniki powodujące hipertrofię chondrocytów oraz opóźniają ich różnicowanie. Hipertroficzne chondrocyty wydzielają VEGF, który dodatkowo pobudza wnikanie naczyń. Tworzy się więc pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego.

Badania *in vitro* z użyciem komórek śródbłonka pochodzących z żyły pępowinowej – HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) i komórek prekursorowych osteoblastów umożliwiły potwierdzenie komunikowania się tych dwóch rodzajów komórek przez koneksynę-43. Jest to konieczne do różnicowania się komórek prekursorowych w osteoblasty [31].

ANGIOGENEZA W GOJENIU RAN

Do szybkiej i efektywnej naprawy uszkodzonych tkanek konieczne jest dostarczenie do nich odpowiedniej ilości tlenu, substancji odżywczych, czynników wzrostu oraz komórek „naprawczych” (usuwających zniszczoną tkankę, drobnoustroje, odbudowujących strukturę narządu). Aby to uzyskać, konieczne jest jak najszybsze odtworzenie sieci naczyń.

Już w początkowym okresie gojenia (faza proliferacyjna) można stwierdzić wysokie stężenie jednego z czynników angiogenetycznych – zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów – bFGF (*basic fibroblasts growth factor*). Powoduje on migrację i proliferację komórek śródbłonka. Pochodzi prawdopodobnie z zapasów nagromadzonych w płytkach krwi i uszkodzonej tkance, gdyż w ciągu pierwszych 24 godzin po urazie obserwuje się jego maksymalne stężenie, które następnie spada [22].

W przeciwieństwie do bFGF, poziom VEGF nie wzrasta bezpośrednio po uszkodzeniu, ale dopiero w kilka dni po nim (ze szczytem w siódmym dniu). Z tego względu VEGF wydaje się być w tym przypadku czynnikiem podtrzymującym, a nie inicjującym wzrost naczyń. Może być wydzielany przez wiele różnych rodzajów komórek, np. przez: makrofagi, neutrofile, keratynocyty, fibroblasty czy śródbłonek, zwłaszcza w warunkach hipoksji często występującej w okolicach rany.

Innymi czynnikami stymulującymi rozwój naczyń w miejscu uszkodzenia są: metaloproteinazy (np. MMP-2, MMP-9), transformujący czynnik wzrostu α i β (TGF – *transforming growth factor*), insulinopodobny czynnik wzrostu – IGF-1 (*insulin-like growth factor*) i interleukina 1 i 8.

Ważny wpływ na angiogenezę mają makrofagi. Zwłaszcza po stymulacji hipoksją, wysokim stężeniem mleczanów lub cytokinami produkowanymi przez śródbłonek mogą one wydzielać czynniki bezpośrednio indukujące wzrost naczyń. Makrofagi powodują również degradację macierzy pozakomórkowej, co ma kluczowe znaczenie dla powstawania nowych naczyń. Wreszcie oddziałują na inne komórki pobudzając je do produkcji substancji proangiogenetycznych [17].

KORA NADNERCZY

Im mocniej unaczyniony jest dany narząd, tym większy wpływ na jego rozwój ma śródbłonek. Przykładem może być rdzeń nadnerczy, zbudowany z komórek chromochłonnych. Wspólna hodowla komórek śródbłonkowych rdzenia z wywodzącą się z rdzenia nadnerczy linią PC12 powoduje różnicowanie się tych ostatnich w kierunku komórek chromochłonnych – zarówno dzięki śródbłonkowym czynnikom humoralnym, jak i bezpośredniemu kontaktowi komórek (powodującemu m.in. wzrost ekspresji c-fos w komórkach PC12) [20].

Podobnie jest z korą nadnerczy, w której sinusoidy otaczają wyspy komórek wytwarzających hormony sterydowe. W hodowli wykazano, że ECs mogą modulować wydzielanie aldosteronu przez komórki warstwy kłębkowatej tego narządu (tlenek azotu produkowany przez śródbłonek hamuje syntezę aldosteronu, natomiast endotelina-1 (ET-1) i inne podobnie działające czynniki białkowe zwiększają jego syntezę) [24, 9].

MIĘSIEŃ SERCOWY

W trakcie rozwoju serca istnieje ścisły związek pomiędzy śródbłonkiem wsierdzia (*endocardium*) a warstwą mięśniową (*myocardium*). Sygnały z ECs są jednym z czynników odpowiedzialnych za dojrzewanie miokardium. Neuregulina, wydzielana przez te komórki, łączy się receptorami ErbB2 (HER-2) i ErbB4 (HER-4) na powierzchni kardiomiocytów i powoduje wytworzenie w nich beleczkowania [19]. VEGF i TGF- β , produkowane przez śródbłonek, tkankę mięśniową i łączną, odpowiadają za prawidłowe formowanie się połączenia między tymi dwoma warstwami serca. Parakryne czynniki wydzielane przez endotelium modulują również wzrost mięśnia oraz siłę i częstość skurczów – np. tlenek azotu czy prostacyklina (PGI₂) zapobiegają hipertrofii i zmniejszają siłę skurczu, natomiast endotelina i angiotensyna II mają działanie odwrotne [15, 3].

Również mięsień sercowy wpływa modulująco na budowę i funkcję naczyń. Wszczepienie fragmentu tkanki serca do ucha powoduje, że wrastające w nie naczynia mają w śródbłonku czynnik von Willebranda, charakterystyczny dla kapilarów serca (ale nie ucha) [1].

NERKI

Kolejnym przykładem wspólnego rozwoju naczyń i narządów są nerki, w których kanaliki i cewki zbiorcze położone są w pobliżu naczyń, a rozwój sieci naczyniowej (stymulowany głównie przez VEGF) pociąga za sobą proliferację nabłonka układu zągęszczającego mocz. Tlenek azotu, wydzielany przez ECs, jest jednym z czynników kontrolujących (zmniejszających) transport jonów sodowych przez błony nabłonka kanalika bliższego i cewek zbiorczych – zwiększa w nich poziom cGMP oraz zmniejsza aktywność pompy sodowo-potasowej (Na,K-ATP-azy) [28, 16]. Brak przepływu w naczyniach powoduje zmiany degeneracyjne śródbłonka, a to z kolei pociąga za sobą powstanie podobnych zmian w innych komórkach nerki (m.in. podocytach i komórkach mezangialnych).

TRZUSTKA I WĄTROBA

Także rozwój trzustki uzależniony jest od endotelium, głównie dużych naczyń (zawiązka aorty i żył żółtkowych). Znajdują się one w bezpośrednim sąsiedztwie pączkujących z endodermy jelita pęcherzyków będących załączkiem gruczołu trzustkowego. ECs promują różnicowanie się tych komórek w kierunku wydzielających insulinę i glukagon oraz tworzenie się wysp trzustkowych przez oddzielanie grup komórek od pączków endodermy jelitowej. U żabich embrionów zaburzenia formowania się aorty powodują zmniejszoną ekspresję genów trzustkowych w nabłonku endodermalnym. Natomiast zwiększenie ekspresji VEGF-A zwiększa liczbę naczyń trzustkowych oraz prowadzi do hiperplazji wysepki Langerhansa. Także w innych bogato unaczynionych rejonach ciała (np. w żołądku, dwunastnicy) mogą wystąpić ektopowe ogniska komórek wydzielających insulinę. Wspólna hodowla komórek endodermy grzbietowej ze śródbłonkiem aorty (ale nie z innymi komórkami) z wczesnych embrionów indukuje w nich ekspresję genów charakterystycznych dla trzustki [12].

Interakcje między śródbłonkiem i endoderma (tym razem z brzusznej części jelita) są konieczne także w rozwoju wątroby. W wyniku tych oddziaływań, komórki nabłonka endodermalnego oddzielają się od jelita i migrują do przegrody poprzecznej mezenchymy mieszając się z angioblastami. Zaburzenie tych interakcji (np. w wyniku mutacji genu dla VEGFR2 (Flk-1)) powoduje zahamowanie odłączania się od jelita oraz proliferacji komórek prekursorowych wątroby (wyniki te potwierdzono zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*) [18]. LeCouter i wsp. wykazali, że VEGF-A stymuluje ECs do wydzielania czynników promujących proliferację hepatocytów [14]. Także dożylnie podanie VEGF-A powoduje powiększenie wątroby, głównie w wyniku namnożenia hepatocytów (pod wpływem IL-6 i czynników wzrostu wydzielanych przez mające VEGFR-1 (Flt-1) komórki zatok naczyniowych) oraz działa protekcyjnie na wątrobę, chroniąc ją przed działaniem takich czynników toksycznych, jak np. czterochlorek węgla (CCl₄). Natomiast stymulacja VEGFR-2 (Flk-1) prowadzi jedynie do proliferacji ECs.

Pewne dane przemawiają jednak przeciw przyjętej teorii oddziaływań śródbłonkowo-endermalnych w organogenezie trzustki i wątroby. W doświadczeniach na *Brachydania verio* (zebra fish) ze zmutowanym genem *cloche* (zmniejszoną liczbą komórek śródbłonkowych) nie wykazano zaburzeń rozwoju wątroby i trzustki [6]. Różnice te mogą jednak wynikać z odmienności gatunkowej ryb i wyższych kręgowców (zwłaszcza pod względem funkcji cytokin) i wymagają dalszych badań.

Wymienione zależności nie wyczerpują wszystkich zagadnień związanych z rolą naczyń w trakcie rozwoju organizmu. Zasygnalizowano tylko niektóre ze skomplikowanych relacji między śródbłonkiem a otaczającymi go komórkami. Część z nich wymaga dalszych badań w celu potwierdzenia bądź zanegowania postawionych hipotez oraz odpowiedzi na nowe pytania.

LITERATURA

- [1] AIRD WC, EDELBERG JM, WEILER-GUETTLER H, SIMMONS WW, SMITH TW, ROSENBERG RD. Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J Cell Biol* 1997; **138**: 1117–1124.
- [2] BATES D, TAYLOR GI, MINICHIELLO J, FARLIE P, CICHOWITZ A, WATSON N, KLAGSBRUN M, MAMLUK R, NEWGREEN DF. Neurovascular congruence results from a shared patterning mechanism that utilizes Semaphorin3A and Neuropilin-1. *Dev Biol* 2003; **255**: 77–98.
- [3] BRUTSAERT DL, FRANSEN P, ANDRIES LJ, De KEULENAER GW, SYS SU. Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovasc Res* 1998; **38**: 281–290.
- [4] CLEAVER O, MELTON DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003; **9**: 661–668.
- [5] DAVIS S, ALDRICH TH, JONES PF, ACHESON A, COMPTON DL, JAIN V, RYAN TE, BRUNO J, RADZIEJEWSKI C, MAISONPIERRE PC, YANCOPOULOS GD. Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning. *Cell* 1996; **87**: 1161–1169.
- [6] FIELD HA, OBER EA, ROESER T, STAINIER DY. Formation of digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev Biol* 2003; **253**: 279–280.
- [7] FRUTTINGER M. Development of the mouse retinal vasculature: Angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 522–527.
- [8] GERBER HP, FERRARA N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 2000; **10**: 223–228.
- [9] HANKE CJ, CAMPBELL WB. Endothelial cell nitric oxide inhibits aldosterone synthesis in zona glomerulosa cells: modulation by oxygen. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; **279**: E846–E854.
- [10] HUNGERFORD JE, LITTLE CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* 1999; **36**: 2–27.
- [11] HUTLEY LJ, HERINGTON AC, SHURETY W, CHEUNG C, VESEY DA, CAMERON DP, PRINS JB. Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; **281**: E1037–E1044.
- [12] LAMMERT E, CLEAVER O, MELTON D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 2001; **294**: 564–567.
- [13] LeCOUTER J, KOWALSKI J, FOSTER J, HASS P, ZHANG Z, DILLARD-TELM L, FRANTZ G, RANGELL L, DEGUZMAN L, KELLER GA, PEALE F, GURNEY A, HILLAN KJ, FERRARA N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001; **412**: 877–884.
- [14] LeCOUTER J, MORITZ DR, LI B, PHILLIPS GL, LIANG XH, GERBER HP, HILLAN KJ, FERRARA N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003; **299**: 890–893.
- [15] LI K, ROULEAU JL, CALDERONE A, ANDRIES JL, BRUTSAERT DL. Endocardial function in pacing-induced heart failure in dog. *J Mol Cell Cardiol* 1993; **25**: 529–540.
- [16] LINAS SL, REPINE JE. Endothelial cells regulate proximal tubule epithelial cell sodium transport. *Kidney Int* 1999; **55**: 1251–1258.

- [17] LINGEN MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 2001; **125**: 67–71.
- [18] MATSUMOTO K, YOSHITOMI H, ROSSANT J, ZARET KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001; **294**: 559–563.
- [19] MEYER D, BIRCHMEIER C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 1995; **378**: 386–390.
- [20] MIZRACHI Y, NARANJO JR, LEVI BZ, POLLARD HB, LELKES PI. PC12 cells differentiate into chromaffin cell-like phenotype in coculture with adrenal medullary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6161–6165.
- [21] NEUFELD G, COHEN T, SHRAGA N, LANGE T, KESSLER O, HERZOG Y. The Neuropilins: Multifunctional Semaphorin and VEGF Receptors that Modulate Axon Guidance and Angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; **12**: 13–19.
- [22] NISSEN NN, POLVERINI PJ, GAMELLI RL, DiPIETRO LA. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery* 1996; **119**: 457–465.
- [23] PALMER TD, WILLHOITE AR, GAGE FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000; **425**: 479–494.
- [24] ROSOLOWSKY LJ, HANKE CJ, CAMPBELL WB. Adrenal capillary endothelial cells stimulate aldosterone release through a protein that is distinct from endothelin. *Endocrinology* 1999; **140**: 4411–4418.
- [25] SCHLINGEMANN RO, VAN HINSBERGH VWM. Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease. *Br J Ophthalmol* 1997; **81**: 501–512.
- [26] SHINBROT E, PETERS KG, WILLIAMS LT. Expression of the platelet-derived growth factor β receptor during organogenesis and tissue differentiation in the mouse embryo. *Dev Dyn* 1994; **199**: 169–175.
- [27] STEWART PA, WILEY MJ. Developing nervous tissue induces formation blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 1981; **84**: 183–192.
- [28] STOOS BA, CARRETERO OA, FARHY RD, SCICLI G, GARVIN JL. Endothelium-derived relaxing factor inhibits transport and increase cGMP content in cultured mouse cortical collecting duct cells. *J Clin Invest* 1992; **89**: 761–765.
- [29] SURI C, JONES PF, PATAN S, BARTUNKOVA S, MAISONPIERRE PC, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; **87**: 1171–1180.
- [30] VARZANEH FE, SHILLABEER G, WONG KL, LAU DC. Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation *in vitro*. *Metabolism* 1994; **43**: 906–912.
- [31] VILLARS F, GUILLOTIN B, AMEDEE T, DUTOYA S, BORDENAVE L, BAREILLE R, AMEDEE J. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**: C775–C785.
- [32] YODER EJ. Modification in astrocyte morphology and calcium signaling induced by a brain capillary endothelial cell line. *Glia* 2002; **38**: 137–145.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 15.10.2005 r.

Przyjęto: 06.01.2006 r.

ul. Chatubińskiego 5, 02-004 Warszawa

klipski@ib.amwaw.edu.pl

PEPTYDOWA MODULACJA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH PODJEDNOSTKI GONADOTROPIN W PRZEDNIM PŁACIE PRZYSADKI SAMIC SZCZURA

PEPTIDERGIC MODULATION OF GONADOTROPIN SUBUNIT GENE
EXPRESSION IN THE ANTERIOR PITUITARY OF FEMALE RATS

Alina GAJEWSKA

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna k. Warszawy

Streszczenie: Aktywność transkrypcyjna genów kodujących podjednostki gonadotropin (α , LH β , FSH β) w przednim płacie przysadki samic szczura zależy od obecności zestawów specyficznych elementów *cis*- i *trans*regulatorowych zlokalizowanych na promotorach tych genów. Głównym stymulatorem aktywności transkrypcyjnej tych genów jest GnRH – hormon pulsacyjnie uwalniany z zakończeń nerwowych w wyniosłości pośrodkowej podwzgórza i uwalniający hormony gonadotropowe. Wykorzystując model pulsacyjnych, dokomorowych infuzji GnRH, β -endorfiny, galaniny i wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) badano rolę tych peptydów w modulacji ekspresji podjednostek α i LH β mRNA w przednim płacie przysadki owarietomizowanych samic szczura. Ekspresja genów α i LH β była zależna od częstotliwości pulsów GnRH: największą ekspresję mRNA obserwowano po infuzjach z częstotliwością 1 pulsu/godzinę. β -endorfina znacząco obniża ekspresję genów α i LH β , wpływając także na zmniejszenie stabilności ich mRNA w komórkach gonadotropowych. Również VIP, działając poprzez specyficzne receptory VPAC₂ hamuje aktywność układu GnRH w podwzgórzu i obniża poziom mRNA dla podjednostek α i LH β w komórkach gonadotropowych. Natomiast galanina stymuluje ekspresję mRNA dla podjednostek α i LH β w przysadce, jej wpływ zależy od obecności steroidów gonadowych, odbywa się poprzez pobudzające oddziaływanie na aktywność układu GnRH w podwzgórzu i wymaga zaangażowania specyficznych receptorów GALR1 i GALR2. Aktywacja ekspresji genu FSH β zależy zarówno od GnRH, jak i aktywiny, które działając niezależnie i synergistycznie podwyższają poziom FSH β mRNA w przysadce. Peptydowa modulacja (stymulacja lub inhibicja) aktywności endogennego układu GnRH w podwzgórzu prowadzi do znaczących zmian w ekspresji genów kodujących podjednostki gonadotropin, wpływając pośrednio na ich biosyntezę w komórkach gonadotropowych przysadki samic szczura *in vivo*.

Słowa kluczowe: ekspresja genów gonadotropin, przysadka, GnRH, β -endorfina, galanina, wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), aktywina.

Summary: Transcription activity of genes encoding three gonadotropin subunits: (α , LH β , FSH β) depends on specific *cis*- and *trans*-acting regulatory elements located on their promoters. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) is a crucial neurohormon stimulating these genes transcriptional activity.

Pulsatile intracerebroventricular microinjections of GnRH, β -endorphin, vasoactive intestinal peptide (VIP) and galanin in ovariectomized rats revealed their significant role in the modulation of gonadotropin subunits gene expression. LH β and FSH β mRNA expression were stimulated by low frequency GnRH pulses whereas α subunit mRNA level was stimulated also by high frequency pulses. β -endorphin reduced α and LH β gene expression and diminished the stability of both mRNAs. VIP acting through its specific receptors reduced endogenous GnRH system activity and decreased both α and LH β mRNA level in pituitary gland. Instead, galanin up-regulated GnRH receptor activity and exerted stimulatory effect on α and LH β gene expression. Its effect depended on gonadal steroids and specific galanin receptors. FSH β gene expression was dependent both on GnRH and as well as on activin stimulation and both peptides were acting independently and synergistically. Peptidergic modulation (stimulatory or inhibitory) of endogenous GnRH system activity results in a significant changes of gonadotropin subunits mRNA content and, in consequence, may indirectly influence on gonadotropin biosynthesis activity in female rats.

Key words: gonadotropin genes expression, pituitary, GnRH, β -endorphin, galanin, VIP, activin.

WSTĘP

Gonadoliberyna (GnRH), decapeptyd syntetyzowany i dojrzewający w około 1200 wyspecjalizowanych neuronach podwzgórza, a następnie uwalniany z ich zakończeń nerwowych w zewnętrznej warstwie wyniosłości pośrodkowej, stanowi kluczowe ogniwo w neuroendokrynnej regulacji rozrodu. Do krążenia wrotnego przysadki wydzielany jest w formie zsynchronizowanych pulsów powodujących pulsacyjne uwalnianie LH i FSH z komórek gonadotropowych. Istnieje ścisła korelacja czasowa pomiędzy każdym pulsem LH i poprzedzającym go pulsem GnRH, jednak zależność ta nie jest tak rygorystyczna w przypadku pulsów FSH. Zmiany pulsacyjnego wzoru uwalniania GnRH (dotyczące zarówno amplitudy, jak i częstotliwości pulsów) charakteryzujące zmienne stany fizjologiczne w cyklu rozrodczym samic warunkują utrzymanie ich funkcji rozrodczych. U samic szczura zidentyfikowano dwa główne wzorce uwalniania GnRH: uwalnianie podstawowe, odznaczające się niską amplitudą i częstotliwością pulsów GnRH oraz uwalnianie okołoowulacyjne (zachodzące po południu fazy proestrus cyklu), w którym gwałtowny wzrost aktywności generatora pulsów GnRH doprowadza do zdecydowanego zwiększenia amplitudy i częstotliwości pulsów uwalnianego GnRH, wynikiem czego jest wyrzut LH [54]. Na błonie komórek gonadotropowych hormon ten wiąże się ze swym specyficznym, sprzężonym z białkiem G_{q/11 α} receptorem [77], stymulując aktywację fosfolipazy C β , która poprzez hydrolizę fosfatydyloinizytolu uwalnia diacyloglicerol i 1,4,5-trójfosforan inozytolu. Gwałtowny wzrost stężenia 1,4,5-trójfosforanu inozytolu w komórce odpowiada za natychmiastową mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego prowadzącą do uwolnienia LH i FSH z komórek gonadotropowych przysadki. Aktywacja diacylogliceroli prowadzi do aktywacji kilku izozymów kinazy białkowej C, czego konsekwencją może być pobudzenie czterech odmiennych szlaków kinaz aktywowanych mitogenem (*MAP kinase*): p42 MAPK (*p42 MAP kinase/extracellular signal-regulated kinase 2*), JNK (*c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) p38MAPK (*p38 MAP kinase/cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein*), BMK (*Big MAP kinase/*

extracellular signal-regulated kinase 5) [62] w komórkach gonadotropowych. Unikalna właściwość kinaz MAP, polegająca na ich zdolności do translokacji do jądra komórkowego i aktywacji różnych czynników transkrypcyjnych na promotorach genów, powoduje, że enzymy te należą do ważnych regulatorów procesów transkrypcyjnych w komórce, jednak ich precyzyjna rola w regulacji ekspresji genów kodujących podjednostki gonadotropin nie jest w pełni wyjaśniona. Rodzina hormonów glikoproteinowych składa się z hormonów przysadkowych luteinizującego (LH), folikulo-tropowego (FSH), tyreotropowego (TSH) oraz łożyskowej gonadotropiny (CG) opisanej u konia i naczelnych. Hormony te są heterodimerami, składającymi się z glikoproteinowej podjednostki α (α GSU) o sekwencji aminokwasowej identycznej dla wszystkich hormonów tej rodziny oraz odrębnej i odpowiedzialnej za specyficzność każdego hormonu, podjednostki β . Obecny stan badań nie pozwala jednoznacznie określić, poprzez jakie szlaki kinaz MAP GnRH mógłby selektywnie regulować ekspresję genów podjednostek gonadotropin w komórkach gonadotropowych. W badaniach Weck i wsp. [95] transkrypcja genu podjednostki α była zależna od aktywacji szlaku PKC (*protein kinase C*) i ERK (*externally regulated kinase*) w komórce, podczas gdy wzrost stężenia wapnia preferencyjnie stymulował transkrypcję genu LH β . Przeciwną zależność obserwowali Saunders i wsp. [71] wykazując, że aktywacja promotora genu α zależna była od wzrostu stężenia wapnia wewnątrz komórki, natomiast genu LH β zachodziła przede wszystkim poprzez aktywację szlaku PKC. Pobudzenia szlaku PKC/ERK w zależnej od GnRH transkrypcji genu LH β nie obserwowali natomiast Yokoi i wsp. [99] wykazując z kolei zaangażowanie szlaku JNK, który poprzez fosforylację białka transkrypcyjnego *c-jun* odpowiada za aktywację kompleksu transkrypcyjnego AP-1. Jednakże wyniki otrzymane przez Harrisa i wsp. [28] wykazują stymulację szlaków ERK i JNK w komórkach gonadotropowych zarówno w podstawowej, jak i GnRH-zależnej aktywacji promotora genu LH β .

ELEMENTY REGULATOROWE NA PROMOTORZE GENU α

Obecnie wiadomo już, że na promotorach genów podjednostek α , LH β i FSH β istnieją odrębne układy elementów *cis*- i *trans*-regulatorowych. Za specyficzną aktywację genu α w komórkach gonadotropowych przysadki odpowiedzialny jest zestaw kilkunastu elementów regulatorowych promotora, wśród których szczególną rolę odgrywa miejsce CRE (*cAMP-responsive element*) zlokalizowane w pozycji *cis* pomiędzy -150 a -200 pz promotora. U ludzi, na promotorze genu α występują dwa (o sekwencji TGACGTCA), zaś u myszy jedno (o sekwencji TGATGTCA) palindromiczne miejsce CRE, do których w pozycji *trans* mogą wiązać się: białko CREB, białko modulujące aktywność CRE oraz białko *c-Jun* aktywujące czynniki transkrypcyjne ATF1 i ATF2 [29]. Elementem *cis*-regulatorowym zaangażowanym w podstawową ekspresję genu α w komórkach gonadotropowych jest także miejsce PGBE (*pituitary glycoprotein hormone basal element*), występujące na promotorze ludzkim w pozycji -329/-320, zaś na mysim pomiędzy -344/-300 pz, do którego wiążą się *trans*-działające

białka LH2 [67], Lim3 [85] i pLIM [32] należące do rodziny białek homeotycznych LIM. Z miejscem PGBE sąsiaduje miejsce α BE (α basal element) składające się z obszaru α BE1 (–316/–302 pz) i α BE2 (–296/–285 pz), do których wiążą się białka α BP1 i α BP2. Interakcja białek wiążących się do miejsc PGBE i α BE powoduje synergistyczny wpływ na transkrypcję genu α [30].

W podstawową transkrypcję tego genu zaangażowane jest także, należące do rodziny homeotycznej, białko Pitx-1 (*pituitary homeobox factor-1*) wiążące się do miejsca Pitx-1-RE (na promotorze ludzkim w pozycji –80/–60 pz, zaś mysim w pozycji –398/–385pz) [85]. Białko Pitx-1 kodowane jest przez gen należący do podrodziny genów *bicoid* typu *homeobox* (*bicoid-related homeobox genes*) [19] i zaangażowane jest w aktywację wielu genów w komórkach już zróżnicowanych, w tym kluczowych w aktywności osi rozrodczej trzech genów podjednostek gonadotropin (α , LH β , FSH β) i genu dla receptora GnRH. Do obszaru GSE (*gonadotrophic specific element*), w pozycji –146/–111 pz (u ludzi) lub –398/–385pz (u myszy) wiąże się czynnik steroidogenny SF-1 należący do nadrodziny białek receptorów jądrowych o nieznanym ligandzie (*orphan nuclear receptor*), którego wpływ na transkrypcję genu α jest autonomiczny i niezależny od obecności innych czynników transkrypcyjnych [30]. Badania aktywności transkrypcyjnej promotora ludzkiego genu α dowodzą, że do jej wzrostu przyczynia się także zlokalizowany w pozycji –161/–141 pz, *cis*-działający α -ACT (α activating element), do którego w pozycji *trans* wiążą się poprzez palce cynkowe białka GATA2 i GATA3 [78]. Należą one do rodziny białek (*GATA binding proteins*) rozpoznających sekwencję GATA na promotorze. W procesie tym uczestniczą również *cis* aktywne obszary *E-box* promotora (pozycja –21/–16 oraz –51/–45), z którymi w pozycji *trans* współpracują białka α EB1, α EB2 oraz czynnik USF (*upstream stimulatory factor*) należące do rodziny białek typu HLH (*helix-loop-helix*) [36]. Eksperymenty na mysich liniach komórek gonadotropowych dowodzą, że za wrażliwość genu α na stymulację GnRH odpowiedzialne są dwa elementy regulatorowe. Jednym z nich jest położony w pozycji –416/–385 promotora obszar GnRH-RE (*GnRH response element*) [73], do którego wiąże się *trans* działające białko z rodziny białek transkrypcyjnych Ets. Drugim *cis*-regulatorowym elementem uczestniczącym w aktywacji transkrypcyjnej genu po stymulacji GnRH jest region PGBE promotora, do którego wiążą się białka z rodziny białek homeotycznych LIM: LH2 [67] i Lhx [85].

ELEMENTY REGULATOROWE NA PROMOTORZE GENU LH β

Znaczący postęp w poznaniu budowy i działania promotora genu LH β stał się możliwy dzięki udanej generacji kilku linii myszy transgenicznym, a zwłaszcza mysiej, gonadotropowej linii komórkowej L β T2 charakteryzującej się ekspresją podjednostki LH β [1]. Wszystkie dotychczas zidentyfikowane elementy regulatorowe zlokalizowane na promotorze genu LH β znajdują się w obszarze –500 pz od miejsca inicjacji transkrypcji, a identyfikacja elementów *cis*-regulatorowych w obrębie tego promotora doprowadziła do wyodrębnienia dwóch obszarów, które tworzą dystalny region A (–490/352 pz)

oraz proksymalny region. B (-207/82 pz). U szczura, w obszarze dystalnym promotora, w pozycjach -450/-434 pz i pozycji -366/-354 pz znajdują się dwa *cis*-regulatorowe miejsca wiążące czynnik transkrypcyjny Sp1. Białko Sp-1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych Cys₂-His₂ wiążących się z DNA za pomocą palców cynkowych po rozpoznaniu sekwencji bogatych w GC. Mutacje uniemożliwiające wiązanie się białka Sp-1 z tym regionem promotora znacząco redukują zarówno jego podstawową aktywność, jak też osłabiają stymulacyjny wpływ wywierany na ten gen przez GnRH [39]. Ponadto w pozycji -443/-434 pz szczurzego promotora znajduje się tzw. region CArG (*C*ArG *box*) o sekwencji CCATTTTGG [94] odgrywający krytyczną rolę we wrażliwości genu LHβ na pulsację GnRH. Sekwencja CArG nie występuje na bydłecym promotorze genu LHβ i do tej pory nie poznano białka regulatorowego wiążącego się do tego obszaru promotora. Natomiast w obrębie proksymalnej części promotora genu LHβ do specyficznych *cis*-regulatorowych sekwencji wiążą się trzy *trans*-działające białka regulatorowe. Pierwszym z nich jest czynnik steroidogenny SF-1 (*steroidogenic factor-1*), który do DNA promotora genu LHβ u szczura wiąże się w obrębie dwóch funkcjonalnych miejsc GSE znajdujących się w pozycji -128/-121 (sekwencja TGACCTG) i -59/-52 (sekwencja CGGCCTTG) [27], a których znaczenie w aktywacji tego genu wykazano zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [34]. U myszy pozbawionych genu *ftz-fl* kodującego białko SF-1, poziom mRNA dla podjednostki LHβ był niewykrywalny [35], zaś mutacja w obrębie miejsca 5'-GSE bydłeczego promotora znacząco zmniejszyła ekspresję genu w stosunku do poziomu stymulowanego przez niezmutowany promotor [42]. Białkiem o kluczowej roli w regulacji transkrypcji genu LHβ jest białko Egr-1 (*early growth response protein*) należące do rodziny białek transkrypcyjnych charakteryzujących się obecnością palców cynkowych z motywami Cys₂-His₂ i których geny ulegają szybkiej aktywacji (*immediate-early response genes*). W komórkach przysadki gwałtowna indukcja ekspresji tego białka zachodzi tylko po stymulacji promotora genu LHβ przez GnRH, dzięki czemu może być ono uważane za jeden z głównych efektorów (*downstream effector*) stymulacji przez ten neurohormon [100]. Białko Egr-1 zawiera wewnętrzną, 34-aminokwasową domenę inhibitorową, a białkami regulującymi aktywność białka Egr-1 są białka Nab-1 i Nab-2 (*nuclear growth factor 1-A binding proteins*), których funkcją jest represja aktywności białka Egr-1 [83]. Wydaje się, iż białko Nab-1 może być jednym z istotnych elementów zaangażowanych w regulację aktywności promotora genu LHβ. Miejscami *cis*-regulatorowymi odpowiedzialnymi za wiązanie białka Egr-1 na promotorze genu LHβ są pozycje -112/-105pz (sekwencja CGCCCCG) oraz -50/-42pz (sekwencja: CGCCCCAC) [44], a mutacje w ich obrębie całkowicie hamują zdolność białka Egr-1 do aktywacji tego promotora [98]. W pozycji -100/-95pz (sekwencja AGATTA), pomiędzy sekwencjami wiążącymi białko Egr-1, znajduje się miejsce wiązania białka Pitx-1, czwartego czynnika transkrypcyjnego zidentyfikowanego na promotorze genu LHβ [85]. Ekspresja białka Pitx1 w heterologicznych liniach komórkowych aktywuje promotor genu LHβ dzięki interakcji z białkami SF-1 i Egr-1 [84]. Ostatnie badania wskazują na obecność drugiego, zlokalizowanego w pozycji -73/-52 pz miejsca wiążącego białko Pitx-1 na tym promotorze [37]. Do pełnej, zależnej od GnRH aktywacji promotora genu LHβ niezbędne

jest współdziałanie wszystkich wiążących się doń białek regulatorowych. Ze względu na specyfikę lokalizacji miejsc *cis*-regulatorowych, które odpowiadają za wiązanie tych białek do właściwych obszarów promotora, wydaje się, iż aktywująca transkrypcję interakcja wszystkich białek regulatorowych wymaga udziału niezidentyfikowanego jeszcze kompleksu adaptorowego. Zaproponowano model [38], zgodnie z którym pojawiające się po aktywacji receptora GnRH białko Egr-1 wiąże się ze swymi miejscami na promotorze i wraz z białkami SF-1 i Pitx1 tworzy trzelementowy, proksymalny kompleks regulatorowy synergistycznie oddziałujący z dystalnie wiążącymi się białkami Sp-1 i nieznanym białkiem z obszaru CARG. Kluczową rolę w integracji wpływów wywieranych przez białka Sp-1 i Egr-1 pełni białko SF-1 [38], zaś białko Pitx-1 pełni rolę funkcjonalnego liganda dla białka SF-1.

ELEMENTY REGULATOROWE NA PROMOTORZE GENU FSH β

Stosunkowo najmniej poznany jest układ *cis*- i *trans*-regulatorowych elementów działających na promotorze genu FSH β , jednakże uzyskanie linii gonadotropowej L β T2 pozwala na coraz pełniejszą identyfikację obszarów kluczowych dla aktywacji tego genu. W pozycjach -120 i -83 pz promotora genu szczura zlokalizowano dwa miejsca wiążące białko aktywatorowe AP-1 (*activator protein*) [81], które są zaangażowane w zależną od GnRH stymulację tego genu [33], lecz nie są odpowiedzialne za stymulację tego genu przez aktywinę. W aktywacji owczego promotora genu FSH β (oFSH β) biorą też udział dwa miejsca *cis*-regulatorowe zlokalizowane w dystalnej części promotora: -4152/-2878 pz oraz -2550/-1809 pz [90]. Natomiast w proksymalnej części promotora genu FSH β znajdują się dwa miejsca wiążące czynnik SF-1, a także jedno miejsce wiążące czynnik transkrypcyjny NFY (*nuclear transcription factor Y*) [69]. Na 5'końcu promotora owczego genu FSH β , pomiędzy pozycją -2067 a -120 pz, zidentyfikowano sześć, zaś na promotorze szczurzego genu – trzy [64] miejsca wrażliwe na progesteron, dzięki którym może on bezpośrednio modulować aktywność transkrypcyjną genu. Również białka z rodziny homeotycznej LIM uczestniczą w regulacji podstawowej aktywności promotora genu FSH β , gdyż do miejsca P2 (-140/-50- pz) wiąże się białko Ptx-1, zaś do obszaru -230/-199 pz – białko Pitx2 [82]. Ponadto, białka te zaangażowane są również w aktywację zależną od GnRH (Ptx1) oraz aktywiny (Ptx2). Stymulacja aktywności promotora genu FSH β przez aktywinę odbywa się przede wszystkim poprzez kompleks białek Smad3/Smad4 (*mad related protein*) będących homologami białek Mad (*Max dimerizer*). Smad3/Smad4 wiążą się do sekwencji palindromicznej GTCTAGAC lub do motywu CAGA. Na promotorze genu szczura kompleks ten oddziałuje w regionie SBE (*Smad Binding Element*) zlokalizowanym w pozycji -281/-253 pz. Natomiast na promotorze owczego genu FSH β zidentyfikowano trzy regiony niezbędne do pełnej aktywacji promotora przez aktywinę: obszar dystalny (-973/-962 pz) wiążący białko Smad4, miejsce -134, do którego przyłącza się kompleks białek Smad4 z należącymi do rodziny białek homeotycznych TALE (*three amino acid loop extension*) białkami Pbx1 (*pre B cell transformation-related transcription*

factor) i Prep1 (*Pbx regulating protein-1*) oraz miejsce -167 również wiążące białka Pbx1 i Prep1 [2]. Ostatnio wykazano także, iż należące do rodziny TGF β (*transforming growth factors β*) i odpowiedzialne za morfogenezę kości i tkanki chrzęstnej białka BMP6 i BMP7 (*bone morphogenetic proteins*) stymulują aktywność owczego promotora genu FSH β , a także ekspresję mRNA dla tej podjednostki *in vivo* oraz *in vitro* [34].

PULSY GnRH A EKSPRESJA GENÓW PODJEDNOSTEK α , LH β I FSH β *IN VIVO*

Zmienna częstotliwość pulsów GnRH jest nie tylko głównym elementem regulującym podstawowe i okołouwalacyjne uwalnianie gonadotropin, ale pełni też krytyczną rolę w specyficznej aktywności transkrypcyjnej genów ich podjednostek. Optymalną techniką służącą badaniu zmian poziomu mRNA kodujących podjednostki gonadotropin w przednim płacie przysadki *in vivo* jest infuzja do trzeciej komory mózgu (bezpośrednio w pobliże układu podwzgórze-przysadka) substancji, które mogłyby wpływać na poziom ich ekspresji. Takie podejście metodologiczne wydatnie zmniejsza, pojawiające się przy podaniu do krążenia ogólnego, ryzyko degradacji infundowanych substancji, pozwalając tym samym na stosowanie dawek zbliżonych do stężeń fizjologicznych, eliminuje możliwość ich oddziaływania na inne tkanki, pozwala też uniknąć trudności w przenikaniu tych substancji przez barierę krew-mózg. Dokomorowo infundowane substancje mogą przeniknąć do krążenia wrotnego przysadki przy udziale tanycytów, komórek wysięlających ściany i podstawę trzeciej komory [3] i w konsekwencji modulować aktywność transkrypcyjną genów kodujących podjednostki gonadotropin w przysadce. W badaniach własnych [20] wykorzystujących model owariotomizowanych samic, którym do trzeciej komory mózgu pulsacyjnie infundowano GnRH, obserwowano zależną od częstotliwości tych pulsów ekspresję genów kodujących podjednostki LH. Analiza *Northern-blot* wykazała bowiem, iż największa stymulacja poziomu mRNA dla podjednostki α i LH β wystąpiła po infuzjach z częstotliwością 1 puls/godzinę, natomiast po infuzjach z częstotliwością 4 pulsy/godzinę aktywacji ulegał jedynie gen podjednostki α . Zatem, promotory obu genów wydają się odznaczać specyficzną wrażliwością na częstotliwość pulsów GnRH: promotor genu α GSU może być bowiem aktywowany przez pulsy GnRH o takiej częstotliwości, która jest już nieefektywna w aktywacji promotora genu LH β . W tych samych badaniach stwierdzono również, iż u samic szczura w fazie diestrus, a więc w okresie najmniejszej endogennej aktywności układu GnRH w podwzgórze, pulsacyjnie infundowany GnRH powodował największy wzrost poziomu α i LH β mRNA oraz uwalniania LH z komórek gonadotropowych przysadki, podczas gdy w proestrus, w fazie maksymalnej aktywności, wpływ egzogenego GnRH na ekspresję mRNA obu podjednostek oraz uwalnianie LH, choć znaczący, był jednak mniej wyraźny niż w diestrus [20]. GnRH jest także głównym regulatorem syntezy i uwalniania hormonu folikulotropowego (FSH), niezbędnego w procesie dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, którego brak w organizmie samicy wywołuje bezpłodność

spowodowaną zablokowaniem folikulogenezy. Poziom ekspresji genu $FSH\beta$ odpowiedzialnego za specyficzność biologiczną tego hormonu, jest – podobnie jak genów podjednostek α i $LH\beta$ – zależny od częstotliwości pulsów GnRH oddziałujących na przysadkowy receptor GnRH. W badaniach własnych wykonanych na modelu samic owariotomizowanych, a więc pozbawionych oddziaływań sterydów gonadowych i peptydów jajnikowych (aktywiny, inhibiny i folistatyny), największy wzrost poziomu $FSH\beta$ mRNA (mierzony techniką *Northern-blot*) oraz uwalniania tego hormonu z komórek gonadotropowych stwierdzono po pulsach GnRH infundowanych do trzeciej komory mózgu z częstotliwością 1 puls/godzinę [21]. Jednocześnie, w badaniach tych obserwowano, iż ze wzrostem częstotliwości egzogennych pulsów GnRH zanika wrażliwość genu $FSH\beta$ na stymulacyjne działanie tego neurohormonu [21]. Zależną od niskiej częstotliwości pulsów GnRH ekspresję genu $FSH\beta$ zaobserwowano także u samców po iniekcjach dożylnych [26] oraz w komórkach linii gonadotropowej $L\beta T2$ [5].

β -ENDORFINA A EKSPRESJA GENÓW α I $LH\beta$ W PRZYSADCE *IN VIVO*

Uwalnianie GnRH, pozostając pod kontrolą endogennego generatora pulsów GnRH [55], podlega także bezpośrednim i pośrednim modyfikacjom dzięki neurotransmiterom i peptydom wpływającym na aktywność neuronów GnRH. Jednym z takich peptydów jest β -endorfina, której prekursorem w organizmie jest proopiomelanokortyna (POMC). W centralnym układzie nerwowym istotnym źródłem syntezy β -endorfiny są neurony POMC jądra łukowatego podwzgórza, skąd projektują do innych obszarów mózgu [17]. Ponadto, β -endorfina syntetyzowana jest także w przednim i pośrednim płacie przysadki mózgowej [51] i taka lokalizacja w obrębie układu podwzgórze-przysadka umożliwia jej znaczący udział w regulacji uwalniania zarówno neurohormonów podwzgórzowych, jak i hormonów przysadkowych. Hamujące działanie β -endorfiny na uwalnianie LH z komórek gonadotropowych odbywa się głównie poprzez aktywację μ receptorów będących produktem genu *Mor-1* [92]. Wykazano, iż pobudzenie tych receptorów, występujących w jądrze łukowatym [61] i w zawierającej ciała neuronów GnRH okolicy przedwzrokowej (MPOA) [12], powoduje zmiany w aktywności podwzgórzowych neuronów noradrenergicznych [63] i dopaminergicznych [66], co w konsekwencji wpływa na zahamowanie uwalniania GnRH z wyniosłości pośrodkowej podwzgórza. Hamujące działanie β -endorfiny na uwalnianie GnRH z zakończeń nerwowych może także odbywać się poprzez aktywację receptorów μ zlokalizowanych na neuronach β -endorfinergicznych [41], czyli poprzez ultrakrótką pętlę sprzężenia zwrotnego. Natomiast para- i/lub autokryne oddziaływanie β -endorfiny możliwe jest poprzez zlokalizowane w obrębie wyniosłości pośrodkowej receptory μ występujące zarówno na zakończeniach neuronów, jak i tanycytach [4]. Poprzez bezpośrednie połączenia synaptyczne pomiędzy aksonami neuronów proopiomelanokortynowych a neuronami GnRH w obszarze przedwzrokowym podwzgórza istnieje także droga bezpośredniego wpływu opioidów na aktywność neuronów GnRH [48] Udokumento-

wane, hamujące zaangażowanie β -endorfiny w uwalnianiu GnRH z wyniosłości pośrodkowej podwzgórza stwarza przesłanki do przypuszczenia, że skutkiem takiego działania może być nie tylko obniżone uwalnianie LH z przysadki, lecz w konsekwencji także zmniejszona biosynteza gonadotropin w komórkach gonadotropowych. W badaniach własnych wykorzystujących technikę *Northern-blot* obserwowano, że po pulsacyjnych, dokomorowych infuzjach β -endorfiny następuje obniżenie poziomu mRNA dla obu podjednostek LH w przysadce [20]. Nie można wykluczyć, że efekt ten był wynikiem bezpośredniego, przysadkowego oddziaływania infundowanej β -endorfiny na uwalnianie LH [13]. Jednak bardziej prawdopodobne wydaje się być jej pośrednie, *via* zahamowanie uwalnianie GnRH obniżające działanie na zawartość obu mRNA. Ponadto, eksperymenty te wykazały także, iż GnRH oraz β -endorfina wywołują przeciwstawne efekty na długość ogonków poliadenylacyjnych poly (A) na 3' końcu α i LH β mRNA. O ile bowiem egzogeny GnRH spowodował wydłużenie regionu poly (A) mRNA dla obu podjednostek w stosunku do wielkości obserwowanej po owariektomii, to podanie β -endorfiny zmniejszyło długość poly(A) na obu badanych mRNA do poziomu obserwowanego u samic nieowariektomizowanych [20]. Tak więc zależna od rodzaju interwencji fizjologicznej zmienna długość poly (A) obserwowana może być nie tylko wskazówką co do stabilności poszczególnych mRNA, lecz także indeksem stopnia ich stymulacji przez GnRH.

GALANINA A EKSPRESJA GENÓW α I LH β W PRZYSADCE *IN VIVO*

Także galanina, 29/30 aminokwasowy peptyd po raz pierwszy wyizolowany z komórek jelita cienkiego świni, a wkrótce wykryty zarówno w obwodowym, jak i centralnym układzie nerwowym [75], jest peptydem, który w znaczącym stopniu uczestniczy w modulacji uwalniania GnRH/LH z układu podwzgórze-przysadka. W obrębie centralnego układu nerwowego najwyższe stężenia galaniny stwierdzono w podwzgórzu, a zwłaszcza w obrębie wyniosłości pośrodkowej, w obszarze przedwzrokowym w jądrze łukowatym, przykomorowym, nadwzrokowym i grzbietowo-przyśrodkowym oraz poza podwzgórzem: w miejscu sinawym i jądrze pasma samotnego. Ekspresja mRNA dla galaniny w neuronach GnRH [52], jak też zmieniająca się w cyklu estralnym jej zawartość w wyniosłości pośrodkowej ze szczytem występującym w fazie proestrus [50] wskazywały, że syntetyzowana w podwzgórzu galanina może być bezpośrednio zaangażowana w modulację neurosekrecji GnRH i okołowulacyjnego uwalniania LH z komórek przysadki. Ponadto, wyraźnie podwyższony poziom mRNA dla galaniny obserwowany w neuronach GnRH ponad 24 godziny po uwolnieniu LH [18] sugerował, że jej synteza może być wymagana również w następnych fazach cyklu estralnego. Biorąc pod uwagę fakt, iż galanina jest syntetyzowana w neuronach podwzgórza, uwalnia się pulsacyjnie i synchronicznie z GnRH, a jej antagonist hamuje uwalnianie GnRH i pulsację LH [50], może być ona istotnym czynnikiem zaangażowanym w fizjologiczną regulację pulsacyjnej aktywności neuronów GnRH. Istnieją zatem

przesłanki, iż podobnie jak β -endorfina, także galanina może uczestniczyć w modulacji biosyntezy LH *in vivo*. Istotnie, w badaniach własnych wykonanych na owariotomizowanych i suplementowanych steroidami gonadowymi samicach szczura, które otrzymywały pulsacyjne (1 puls/godzinę przez 5 godzin), dokomorowe infuzje galaniny analiza *Northern-blot* wykazała znaczące podwyższenie poziomu mRNA dla podjednostek α i LH β w przysadce [24]. Efektywność dokomorowych pulsów galaniny, podawanych z częstotliwością optymalną do aktywacji tych genów przez GnRH, może być więc konsekwencją pobudzającego działania egzogennej galaniny na pulsacyjną aktywność neuronów GnRH. Także niepodwyższony w odniesieniu do grupy traktowanej samym GnRH poziom α i LH β mRNA obserwowany po jednoczesnej infuzji GnRH i galaniny wskazuje, że to układ GnRH w podwzgórzu odgrywa kluczową rolę w modulacyjnych oddziaływaniach galaniny na ekspresję genów LH w przysadce [24]. Brak addytywnego oddziaływania GnRH i galaniny sugeruje wspólną dla obu neuropeptydów i zależną od GnRH drogę aktywacji jego receptora przez galaninę [24]. Istniejące dane dowodzą, że modulacja pobudzenia neuronów GnRH może również odbywać się pośrednio, poprzez wpływ galaniny na aktywność neuronów POMC, które w podwzgórzu brzuszno-przyśrodkowym tworzą synapsy z neuronami galaninerгіcznymi [31]. Ponadto, na neuronach POMC zidentyfikowano też receptory galaninerгіczne [7]. W obszarze jądra łukowatego, głównego miejsca lokalizacji neuronów POMC, galanina oddziałuje na nie zarówno na poziomie presynaptycznym [43] zmniejszając ich aktywację glutaminergiczną, jak też i na poziomie postsynaptycznym [65]. Jeżeli więc galanina zmniejsza hamujące działanie neuronów POMC wywierane na neurony GnRH, to tym samym może również pośrednio stymulować uwalnianie GnRH z zakończeń nerwowych, a zatem wpływać na aktywność receptora GnRH. Konsekwencją aktywacji receptora GnRH jest pobudzenie aparatu biosyntezy gonadotropin w komórce. Istotnie, w badaniach własnych wykazano, że pulsacyjne dokomorowe infuzje galaniny podawane owariotomizowanym i suplementowanym steroidami samicom szczura spowodowały zarówno wzrost ilości miejsc wiążących GnRH, jak i podwyższenie jego powinowactwa do receptora w przednim płacie przysadki [24]. Regulacyjne znaczenie dla aktywacji receptora GnRH może mieć również kolokalizacja galaniny i GnRH występująca w około 45% neuronów GnRH samic szczura [57], jak też fakt, iż neuropeptydy te są jednocześnie uwalniane z zakończeń nerwowych. Wiadomo bowiem, iż zarówno sekrecja, jak i postsynaptyczne działanie neuropeptydu podlega modyfikacji przez substancje, które są syntetyzowane, przechowywane i uwalniane z tej samej komórki [44]. Istnieją też dane wskazujące, iż galanina uwalniana z zakończeń neuronów GnRH może wzmacniać synchronizację i wzmacniać oddziaływania GnRH na poziomie receptora [49].

Fizjologiczne funkcje galaniny są regulowane przez specyficzne receptory błonowe należące do rodziny białek G. Dotychczas zidentyfikowano trzy podtypy receptorów galaniny, lecz w regulacji neuroendokrynnej zaangażowane są tylko receptory GAL-R1 [60] i GAL-R2 [59], których mRNA wykryto w: podwzgórzu, paśmie ukośnym Broca, obszarze przedwzrostkowym, jądrze nadskrzyżowaniowym, jądrze okołokomorowym, jądrze łukowatym, jądrze grzbietowo-przyśrodkowym i w obrębie jądra łukowatego. Rozmieszczenie miejsc wiążących galaninę w podwzgórzu szczura [45] jest skorelowane z obecnością gęstej sieci perikarionów, dendrytów i włókien galaninerгіcznych w obszarze

przedwzrokowym, w jądrze łukowatym, grzbietowo-przyśrodkowym, nadskrzyżowaniowym oraz około- i przykomorowym [75]. Choć obecność mRNA dla GAL-R2 wykryta w obszarze przedwzrokowym, jądrze grzbietowo-przyśrodkowym i łukowatym może świadczyć o post-synaptycznej lokalizacji receptorów, to brak mRNA dla GAL-R1 i GAL-R2 w wyniosłości pośrodkowej przy jednoczesnym wysokim wiązaniu znakowanej galaniny w tej strukturze wskazuje, że receptory te mogą być także transportowane z komórek neurosekrecyjnych do zakończeń nerwowych [59]. Eksperymentalne zastosowanie antagonisty(ów) receptora pozwala na identyfikację funkcji tego receptora w badanym procesie. Po dokomorowej infuzji antagonisty (*galantide*) receptora GAL-R1, jak i GAL-R2 [15] zaobserwowano zahamowanie zarówno podstawowego, jak i stymulowanego przez galaninę wzoru uwalniania GnRH i LH u samic szczura [70]. Na udział podwzgórzowych receptorów galaniny w pośredniczeniu jej oddziaływania na aktywność sekrecyjną neuronów GnRH, a w konsekwencji na profil uwalniania LH wskazuje też znaczące obniżenie ekspresji mRNA dla obu podjednostek LH obserwowane u owarietomizowanych i suplementowanych steroidami gonadowymi samic szczura, które otrzymywały jednoczesne infuzje antagonisty receptora GAL i galaniny [24]. Nie można jednak wykluczyć, iż stymulujące działanie galaniny na syntezę hormonu luteinizującego może także odbywać się poprzez aktywację receptorów galaniny bezpośrednio w przysadce. Wprawdzie nie jest jasne, czy i jakie podtypy receptora galaniny występują na komórkach gonadotropowych u samic, ponieważ GAL-R2 mRNA na tych komórkach zidentyfikowano dotychczas jedynie u samców [15]. Możliwość aktywacji takiego samego, zależnego od kinazy białkowej C szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zarówno przez receptor GAL-R2 [91], jak i receptor GnRH stwarza dodatkową ścieżkę modulacyjną, poprzez którą galanina mogłaby wpływać na poziom ekspresji genów podjednostek LH w przysadce.

WAZOAKTYWNY PEPTYD JELITOWY A EKSPRESJA GENÓW α I LH β *IN VIVO*

Okazało się, że również wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) wyizolowany z komórek układu pokarmowego jest szeroko rozpowszechniony w obwodowym i centralnym układzie nerwowym [46]. Wpływ VIP na aktywność podwzgórza zależy od dwóch aferentnych szlaków VIP-ergicznymi biegnących z ciała migdałowatego (*amygdala*) poprzez prążek końcowy (*stria terminalis*) [68] i ze śródmózgowia (*midbrain*) poprzez wiązkę przyśrodkową przodomózgowia (*medial forebrain bundle*) [53], jak też od syntezy tego peptydu w neuronach jądra nadskrzyżowaniowego (SCN) i okołokomorowego (PVN) [40]. W jądrze nadskrzyżowaniowym, położonym obustronnie u podstawy trzeciej komory mózgu w brzusznej części podwzgórza, jest zlokalizowany zegar biologiczny odpowiedzialny za regulację rytmów okołodobowych w organizmie ssaków. Jądro SCN aktywnie uczestniczy w regulacji okołowodulacyjnego wyrzutu LH i prolaktyny, a leżące tego obszaru podwzgórza powodują stan ciągłego estrus u samic nieowarietomizowanych [8] oraz eliminują zależny od estradiolu wyrzut LH i prolaktyny u zwierząt owarietomizowanych. Spośród kilku neuropeptydów zidentyfikowanych

w SCN, głównie VIP syntetyzowany w jego brzuszno-bocznym (*ventrolateral*) regionie jest odpowiedzialny za uczestnictwo SCN w zależnej od pory dnia synchronizacji okołowulacyjnego wyrzutu LH z komórek przysadki. Umiejscowione w SCN neurony VIP wysyłają aksony m.in. do podwzgórza, w tym do obszaru przedwzrokowego, do przedniego i bocznego podwzgórza, do narządu naczyniowego blaszki końcowej (*organum vasculosum lamina terminalis*) i do pasma ukośnego Broca (*diagonal band of Broca*) [88]. Identyfikacja monosynaptycznego szlaku łączącego zlokalizowane w SCN neurony VIP z ok. 45% neuronów GnRH w podwzgórzu [89] stwarza neuroanatomiczne podstawy do bezpośredniej, zależnej od VIP modulacji aktywności neuronów GnRH. Jednakże neurony VIP, dochodząc z obszaru SCN do jądra okołokomorowego (PVN) i przykomorowego (Pe) [93], mogą również pośrednio wpływać na aktywność neuronów GnRH. Zablokowanie hamującego działania VIP na uwalnianie LH obserwowane po lezji jądra PVN dowodzi bezpośredniego działania VIP na neurony PVN i wskazuje na pośredniczącą rolę tego jądra w zależnej od VIP regulacji aktywności generatora pulsów GnRH [79]. VIP-ergiczna modulacja pulsacyjnego uwalniania GnRH może zachodzić także na poziomie wyniosłości pośrodkowej dokąd projektują neurony VIP i gdzie zidentyfikowano granule zawierające ten neuropeptyd [58]. Niewykluczone też, że VIP uwalniany z neuronów PVN do płynu mózgowego może być transportowany bezpośrednio do wyniosłości pośrodkowej przez wyspecjalizowane komórki (tanocyty) [3]. Także obserwowane po centralnych infuzjach VIP [96] zmniejszenie częstotliwości pulsów LH bez jednoczesnych zmian w ich amplitudzie wskazuje, że pierwotnym miejscem modulującego działania VIP na profil uwalnianego z przysadki LH jest podwzgórze. Choć dotychczas nie wyjaśniono, jakie substancje pośredniczą w hamującym oddziaływaniu VIP na aktywność neuronów GnRH i w konsekwencji na pulsacyjne uwalnianie LH, dotychczasowe dane wskazują, że w procesie tym nie jest zaangażowana dopamina [80] ani endogenne opioidy [97]. Fizjologiczne efekty VIP wywierane są przez dwa, o stosunkowo nieznacznej (47%) homologii ich pierwszorzędowej struktury, podtypy receptora: VPAC₁ i VPAC₂ [86], których pobudzenie wywołuje aktywację szlaku cyklicznej adenylanowej w komórce docelowej. Ostatnie badania wskazują, że fizjologiczny wpływ VIP na aktywność neuronów GnRH może odbywać się za pośrednictwem receptorów VPAC₂, które wykryto na ponad 40% neuronów GnRH u samicy szczura [76]. Biorąc pod uwagę, że VIP jest zaangażowany w modulację pulsacyjnego uwalniania GnRH z wyniosłości pośrodkowej, podjęto próbę wyjaśnienia (podobnie do β -endorfiny i galaniny) jego roli w biosyntezie LH w przysadce. W badaniach własnych wykazano, iż pulsacyjne (1 puls/godzinę przez 5 h) infuzje VIP do trzeciej komory mózgu samic owariotomizowanych i suplementowanych estradiolem spowodowały nie tylko zahamowanie uwalniania LH, lecz również znaczące zmniejszenie poziomu mRNA dla podjednostek α i LH β w przednim płacie przysadki [23]. Natomiast po zablokowaniu aktywności endogennej układu GnRH przez antagonistę (VIP-6-28) jego receptora [74] infundowany pulsacyjnie VIP nie powodował już dalszego obniżenia zawartości mRNA dla obu podjednostek LH. Świadczy to o kluczowej roli funkcjonalnie aktywnego układu GnRH w odbiorze i przeniesieniu modulacyjnych oddziaływań VIP. Wykorzystując specyficznego antagonistę receptora w badaniach tych wykazano też, że modulujący wpływ VIP na ekspresję genów podjednostek

LH odbywa się poprzez receptory VIP, bowiem po jednoczesnych dokomorowych ko-infuzjach VIP 6-28 i VIP samicom szczura, peptyd ten nie zmniejszał poziomu mRNA dla obu podjednostek LH [23]. Nie można jednak wykluczyć, iż infundowany dokomorowo VIP może też częściowo działać bezpośrednio na poziomie przysadki, na przykład zmieniając przepływ krwi w układzie wrotnym i parametry uwalniania LH, tym samym wpływając hamująco na aktywność genów dla obu podjednostek LH.

AKTYWINA A EKSPRESJA GENU PODJEDNOSTKI FSH β W PRZYSADCE *IN VIVO*

O ile modulacyjny wpływ peptydów na poziom ekspresji genów α i LH β odbywa się pośrednio, poprzez ich wpływ na aktywność układu GnRH w podwzgórzu, to ekspresja genu FSH β w przysadce jest bezpośrednio regulowana przez aktywinę, inhibinę i folistatynę [56]. Peptydy te pierwotnie wyizolowano z płynu pęcherzykowego w jajniku [87], a następnie z komórek przysadki, gdzie syntetyzowane są zarówno w komórkach gonadotropowych, jak i komórkach pęcherzykowo-gwiazdzystych (*folliculostellate cells*). Aktywina i inhibina należą do nadrodziny białek TGF β i są heterodimerami podjednostek $\alpha\beta_A$ i $\alpha\beta_B$ (inhibina A i B) lub $\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ i $\beta_A\beta_B$ (aktywina A, B i AB). Aktywina jest stymulatorem uwalniania FSH i ekspresji genu FSH β [47], wpływa bezpośrednio na transkrypcję tego genu [6], indukuje aktywność jego promotora w konstrukcjach z genem reporterowym [2], a także zwiększa stabilność FSH β mRNA w komórkach przysadki [9]. Zależne od aktywiny pobudzenie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej poprzedzone jest serią zmian konformacyjnych w obrębie jej receptora na błonie komórkowej. Najpierw aktywina wiąże się do jednej z dwóch podjednostek typu II swego receptora (ActRII lub ActRIIB), co umożliwia uformowanie heteromerycznego kompleksu z podjednostką I receptora (ActRI lub ActRIB). Po utworzeniu takiego kompleksu aktywacji ulega kinaza serynowo/treoninowa podjednostki typu II, która fosforyluje podjednostkę typu I zapoczątkowuje kaskadę fosforylacji na poziomie post-receptorowym. Choć aktywacja receptora aktywiny uruchamia kilka szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, najważniejszą jest kaskada białek Smad [11]. Spośród ośmiu poznanych białek Smad, aktywina pobudza białka Smad-2 i Smad-3, które są fosforylowane przez podjednostkę typu I receptora i następnie tworzą wiązający się z DNA kompleks z białkiem Smad-4 [72]. Ostatnio wykazano korelację pomiędzy indukowanym aktywiną wzrostem transkrypcji genu FSH β w komórkach przysadki a zwiększoną fosforylacją białek Smad-2 i Smad-3 [14]. Stymulujące oddziaływanie aktywiny na poziom ekspresji własnych receptorów w komórkach gonadotropowych [10] może znacząco wpłynąć na intensywność sygnału aktywującego transkrypcję genu FSH β . Odrębność szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej aktywowanych przez GnRH i aktywinę wskazuje na niezależne oddziaływanie obu peptydów na uwalnianie FSH i ekspresję genu FSH β . Istotnie, w badaniach własnych obserwowano odmienną dynamikę aktywacji uwalniania FSH z komórek gonadotropowych po dożylnych iniekcjach aktywiny i busereliny, gdyż po stymulacji busereliną (agonistą

receptora GnRH) znaczący wzrost uwalniania FSH następował szybciej i trwał dłużej niż po stymulacji aktywiną A [22]. O zaangażowaniu różnych ścieżek regulacyjnych w komórkach gonadotropowych po ich stymulacji aktywiną lub busereliną świadczy też obserwowana w tych badaniach odmienna czasowo dynamika zmian poziomu FSH β mRNA: już po 3 godzinach po iniekcji każdy peptyd znacząco stymulował ekspresję tego genu, jednak dalszy (po 5 godzinach) wzrost ekspresji obserwowano tylko po stymulacji busereliną. Również wyższa zawartość mRNA dla tego genu obserwowana po jednoczesnych iniekcjach tych peptydów [22] świadczy o synergistycznym oddziaływaniu aktywiny A i busereliny na ekspresję genu FSH β . Ostatnio, w badaniach na komórkach linii gonadotropowej L β T2 wykazano, że synergizm aktywiny i GnRH w regulacji aktywności transkrypcyjnej promotora genu FSH β wymaga ekspresji białka Smad3 i związany jest z palindromicznym, *cis*-działającym elementem regulatorowym zlokalizowanym w pozycji -266/-259 promotora tego genu [25]. Pobudzające działanie aktywiny na uwalnianie i biosyntezę FSH może także odbywać się poprzez jej stymulujący i niezależny od GnRH wpływ na syntezę receptorów GnRH zachodzący na poziomie transkrypcji genu receptora [16]. Możliwe jest także jej oddziaływanie na poziomie post-receptorowym, poprzez zaangażowanie w modulację zależnego od GnRH stężenia wapnia w komórce gonadotropowej.

PODSUMOWANIE

Zmienny wzorzec pulsacyjnie uwalnianego GnRH decyduje nie tylko o podstawowym i okołowulacyjnym uwalnianiu gonadotropin, lecz pełni też krytyczną rolę w aktywacji transkrypcji genów α , LH β i FSH β , których promotory odznaczają się specyficzną wrażliwością na częstotliwość pulsów GnRH. W badaniach *in vivo* wykazano, że wyższa częstotliwość egzogennych pulsów efektywnie aktywuje ekspresję tylko genu α , zaś poziom mRNA dla podjednostek LH β i FSH β istotnie wzrasta dopiero po pulsach GnRH o niższej częstotliwości. Modulujący wpływ na ekspresję genów kodujących podjednostki gonadotropin wywierają syntetyzowane w podwzgórzu peptydy, które uczestniczą w modulacji uwalniania GnRH. Po pulsacyjnych, dokomorowych infuzjach β -endorfiny obserwowano obniżenie poziomu mRNA dla podjednostek α i LH β w komórkach gonadotropowych i efekt ten mógł częściowo wynikać ze zmniejszonej stabilności mRNA obserwowanej po infuzjach tego peptydu. Również VIP działając poprzez swe specyficzne receptory obniża aktywność endogennego układu GnRH w podwzgórzu i wpływa hamująco na poziom α i LH β mRNA w przysadce. Wzrost ekspresji genów α i LH β obserwowano natomiast po dokomorowych infuzjach galaniny, która podwyższając aktywność endogennego układu GnRH powoduje zwiększenie aktywności receptora GnRH. Stymulujące działanie galaniny na poziom α i LH β mRNA zależy od obecności sterydów gonadowych i wymaga aktywacji specyficznych receptorów dla galaniny. Poziom FSH β mRNA w przysadce podwyższany jest zarówno przez GnRH, jak i aktywinę. Peptydy te niezależnie i synergistycznie symulują ekspresję genu FSH β .

LITERATURA

- [1] ALARID ET, WINDLE JJ, WHYTE DB, MELLON PL. Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* 1996; **122**: 3319–3329.
- [2] BAILEY JS, RAVE-HAREL N, MacGILIVRAY SM et al. Activin regulation of the follicle-stimulating hormone β -subunit gene involves Smad and TALE homeodomain proteins Pitx-1 and Prep1. *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 1158–1170.
- [3] BARREA CM, KASTIN AJ, FASOLD MB, BANKS WA. Bidirectional saturable transport of LHRH across the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 1991; **261**: E312–E318.
- [4] BEAUVILLAIN JC, MOYSE E, DUTRIEZ V et al. Localization of μ -opioid receptors on the membranes of nerve endings and tanocytes in the guinea-pig median eminence by electron microscopic radioautography. *Neuroendocrinology* 1992; **49**: 925–936.
- [5] BÉDÉCARRATS GY, KAISER UB. Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L β T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology* 2003; **144**: 1802–1811.
- [6] BERNARD DJ. Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone in mouse gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 606–623.
- [7] BOURET S, PREVOT V, CROIX D et al. Expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor messenger ribonucleic acid in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus: effect of testosterone. *Endocrinology* 2000; **141**: 1780–1794.
- [8] BROWN-GRANT K, RAISMANN G. Abnormalities in reproductive functions associated with the destruction of suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lond* 1997; **198**: 279–296.
- [9] CARROLL RS, CORRIGAN AZ, VALE W, CHIN W. Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1991; **129**: 1721–1725.
- [10] DALKIN AC, HAISENLEDER DJ, YASIN M et al. Pituitary activin receptor subtypes and follistatin gene expression in female rats: differential regulation by activin and follistatin. *Endocrinology* 1996; **137**: 548–554.
- [11] DERYNCK R, ZHANG YE. Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF β -family signaling. *Nature* 2003; **425**: 577–583.
- [12] DESJARDINS GC, BRAWER JR, BEAUDET A. Distribution of μ , δ and κ opioid receptors in the hypothalamus of the rat. *Brain Res* 1990; **536**: 114–123.
- [13] DRAGATSIS I, PAPAZAFIRI P, ZILOUDROU C, GEROZISSIS K. Opioids modify the release of LH at the pituitary level: *in vitro* studies with entire rat pituitaries. *J Endocrinol* 1995; **145**: 263–270.
- [14] DUPONT J, McNEILLY J, VAIMAN A et al. Activin signaling pathway in ovine pituitary and L β T2 cells. *Biol Reprod* 2003; **68**: 1377–1387.
- [15] FAHTI Z, CUNNINGHAM AM, IBEN LG et al. Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Mol Brain Res* 1997; **51**: 49–59.
- [16] FERNANDEZ-VASQUEZ G, KAISER UB, ALBARRACIN CT, CHIN WW. Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin-A. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 356–366.
- [17] FINLAY JCW, LINDSHON P, PETRUSZ P. Immunocytochemical localization of β -endorphin containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1981; **33**: 28–42.
- [18] FINN PD, STEINER RA, CLIFTON DK. Temporal patterns of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), *c-fos* and galanin gene expression in GnRH neurons relative to the luteinizing hormone surge in rat. *J Neurosci* 1998; **18**: 713–719.
- [19] GAGE PJ, SUH H, CAMPER SA. The *bicoid*-related Ptx gene family in development. *Mamm Genome* 1999; **10**: 197–200.
- [20] GAJEWSKA A, KOCHMAN K, LERRANT Y et al. Modulation of luteinizing hormone subunit gene expression by intracerebroventricular microinjection of gonadotropin-releasing hormone or β -endorphin in female rat. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1523**: 217–224.
- [21] GAJEWSKA A, LERRANT Y, COUNIS R, KOCHMAN K. FSH β subunit gene expression in long-term ovariectomized rat after pulsatile intracerebroventricular microinjections of GnRH. *Neuroendocrinol Lett* 2000; **21**: 277–281.
- [22] GAJEWSKA A, SIAWRYS G, BOGACKA I et al. *In vivo* modulation of follicle-stimulating hormone release and β subunit gene expression by activin A and the GnRH agonist busarelin in female rats. *Brain Res Bull* 2002; **58**: 475–480.

- [23] GAJEWSKA A, WOLIŃSKA-WITORT E, KOCHMAN K. Vasoactive intestinal peptide modulates luteinizing hormone subunit gene expression in the anterior pituitary in female rat. *Brain Res Bull* 2005; **67**: 319–326.
- [24] GAJEWSKA A, ZWIERZCHOWSKI L, KOCHMAN K. Stimulation of luteinizing hormone subunit gene expression by pulsatile intracerebroventricular microinjection of galanin in female rats. *J Neuroendocrinol* 2004; **16**:558–565.
- [25] GREGORY SJ, LACZA CHT, DETZ AA et al. Synergy between activin A and gonadotropin-releasing hormone in transcriptional activation of the rat FSH β -gene. *Mol Endocrinol* 2005; **19**: 237–254.
- [26] HAISENLEDER DJ, DALKIN AC, ORTOLANO GA et al. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency *in vivo*. *Endocrinology* 1991; **128**: 509–517.
- [27] HALVORSON LM, ITO M, JAMESON JL, CHIN WW. Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone β subunit gene expression. *J Biol Chem* 1998; **273**:14712–14720.
- [28] HARRIS D, BONFIL D, CHUDERLAND D et al. Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LH β -subunit promoter. *Endocrinology* 2002; **143**, 1018–1025.
- [29] HECKERT LL, SCHULTZ K, NILSON JH. The cAMP response elements of the α subunit gene bind similar proteins in trophoblasts and gonadotropes but have distinct functional sequence requirements. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31650–31656.
- [30] HECKERT LL, SCHULTZ K, NILSON JH. Different composite regulatory elements direct expression of the human α subunit gene to pituitary and placenta. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26497–26504.
- [31] HORVATH TL, KALRA SP, NAFTOLIN F, LERANTH C. Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1995; **7**: 579–588.
- [32] HOWARD PW, MAURER RA. A point mutation in the LIM domain of Lhx3 reduces activation of the glycoprotein hormone α -subunit promoter. *J Biol Chem* 2001; **276**: 19020–19026.
- [33] HUANG H-J, SEBASTIAN J, STRAHL BD et al. Transcriptional regulation of the ovine follicle-stimulating hormone β gene by activin and gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Involvement of two proximal activator protein sites for GnRH stimulation. *Endocrinology* 2001; **142**: 2267–2274.
- [34] HUANG H-J, WU JC, SU P, ZHIRNOV O, MILLER WL. A novel role for bnc morphogenetic proteins in the synthesis of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 2001; **142**: 2275–2283.
- [35] INGRAHAM HA, LALA DS, IKEDA Y et al. The nuclear receptor steroidogenic factor acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 1994; **8**: 2302–2312.
- [36] JACKSON SM, GUTIERREZ-HARTMANN A, HOEFFLER JP. Upstream stimulatory factor, a basic-loop-helix-zipper protein, regulates the activity of the α -glycoprotein hormone subunit gene in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 278–291.
- [37] JIANG Q, JEONG K-H, HORTON ChD, HALVORSON LM. Pituitary homeobox (Pitx1) stimulates rat LH β gene expression via two functional DNA-regulatory elements. *J Mol Endocrinol* 2005; **35**: 145–158.
- [38] KAISER UB, HALVORSON LM, CHEN MT. Sp1, steroidogenic factor 1 (SF-1), and early growth response protein 1 (EGR-1) binding sites form a tripartite gonadotropin-releasing hormone response element in the rat luteinizing hormone β gene promoter: an integral role for SF-1. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 1235–1245.
- [39] KAISER UB, SABBAGH E, CHEN MT et al. Sp1 binds to the rat luteinizing hormone β gene promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone stimulated expression of the LH β subunit gene. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12943–12951.
- [40] KALSBECK A, BUIJS RM. Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity. In: The Peptidergic Neuron. (Joose J, Buijs RM, Tilders FJH eds) Prog Brain Res, vol. 92, Elsevier, Amsterdam, 1992: 321–333.
- [41] KELLY MJ, LOOSE MD, RONNEKLEIV OK. Opioids hyperpolarize β -endorphin neurons via μ -receptor activation of a potassium conductance. *Neuroendocrinology* 1990; **52**: 268–275.
- [42] KERI RA, NILSON JH. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone α subunit promoter in gonadotropes in transgenic rats. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10782–10785.
- [43] KINNEY GA, EMMERSON PJ, MILLER RJ. Galanin receptor-mediated inhibition of glutamate release in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 1998; **18**: 3489–3500.
- [44] KUPFERMANN I. Functional studies of cotransmission. *Physiol Rev* 1991; **71**: 683–694.

- [45] LAGNY-POURMIR I, EPELBAUM J. Regional stimulatory and inhibitory effects of guanidine nucleotides on ^{125}I galanin binding in the rat brain: relationships with the rate of occupancy of galanin receptors by endogenous galanin. *Neuroscience* 1992; **49**: 829–847.
- [46] LARSON L-I, FAHRENKRUG J, SCHAFFALITZKY De MUCKADELL O et al. Localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73**: 3197–3200.
- [47] LEE S, RIVIER C. Effect of repeated activin-A treatment on the activity of hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the adult male rat. *Biol Reprod* 1997; **56**: 969–975.
- [48] LERANTH C, Mac LUSKY NJ, SHANABROUGH M, NAFTOLIN F. Immunocytochemical evidence for synaptic connection between proopiomelanocortin-immunoreactive axons and LHRH neurons in the preoptic area of the rat brain. *Brain Res* 1988; **446**: 167–176.
- [49] LIPOSITS Z, REID J, NEGRO-VILAR A, MERCHENTHALER I. Sexual dimorphism in copackaging of luteinizing hormone-releasing hormone and galanin into neurosecretory vesicles of hypophysiotrophic neurons: estrogen dependency. *Endocrinology* 1995; **136**: 1987–1992.
- [50] LOPEZ FJ, MERCHENTHALER I, CHING M et al. Galanin: a hypothalamic-hypophysiotrophic hormone modulating reproductive functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4508–4512.
- [51] MAINS RE, EIPPER B, LING N. Common precursor to corticotropin and endorphins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 3014–3018.
- [52] MARKS DJ, SMITH MS, VRONTAKIS M et al. Regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1993; **132**: 1836–1844.
- [53] MARLEY PD, EMSON PC, HUNT SP. A long ascending projection in the rat brain containing vasoactive intestinal polypeptide. *Neurosci Lett* 1981; **27**: 261–266.
- [54] MARSHALL JC, DALGIN AC, HAISENLEDER D et al. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Rec Prog Horm Res* 1991; **47**: 155–187.
- [55] MARTINEZ de la ESCALERA G, CHOI ALH, WEINER RI. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses. Intrinsic properties of the GT-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1852–1855.
- [56] MATHER JP, MOORE A, LI RH. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; **245**: 200–202.
- [57] MERCHENTHALER I, LOPEZ FJ, NEGRO-VILAR A. Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: anatomical and functional correlates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6326–6333.
- [58] MIKKELSEN JD. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the circumventricular organs of the rat. *Cell Tissue Res* 1989; **255**: 307–313.
- [59] MITCHELL V, BOURET S, HOWARD AD, BEAUVILLAIN J-C. Expression of the galanin receptor subtype GALR2 in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 1999; **16**: 265–277.
- [60] MITCHELL V, HABERT-ORTOLI E, EPELBAUM J et al. Semiquantitative distribution of galanin-receptor (GAL-R1) mRNA-containing cells in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1997; **66**: 160–172.
- [61] MITCHELL V, PREVOT JC, BEAUVILLAIN JC. Distribution and diurnal variations of the μ -opioid receptor expression in the arcuate nucleus of the male rat. *Neuroendocrinology* 1998; **67**: 94–100.
- [62] NAOR Z, BENARD O, SEGER R. Activation of MAPK cascades by G-protein coupled receptor: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**: 91–99.
- [63] NISHIHARA M, HIRUMA H, KIMURA F. Interactions between the noradrenergic and opioid peptidergic system in controlling the electrical activity of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1991; **54**: 321–326.
- [64] O'CONNOR JL, WADE MF, PRENDERGAST P et al. A 362 base pair region of the rat FSH β promoter contains multiple progesterone receptor binding sequences and confers progesterone responsiveness. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **136**: 67–78.
- [65] POULAIN P, DECROCOQ N, MITCHELL V. Direct inhibitory action of galanin on hypothalamic arcuate nucleus neurons expressing galanin receptor Gal-R1 mRNA. *Neuroendocrinology* 2003; **78**: 105–117.
- [66] REYMOND MJ, KAUR C, PORTER JC. An inhibitory role for morphine on the release of dopamine into hypophysial portal blood and on the synthesis of dopamine in tuberoinfundibular neurons. *Brain Res* 1983; **262**: 253–258.
- [67] ROBERSON MS, SCHODERBEK WE, TREMML G, MAURER RA. Activation of glycoprotein hormone α -subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **142**: 141–152.

- [68] ROBERTS GW, WOODHAMS PL, BRYANT MG. VIP in the rat brain: evidence for a major pathway linking the amygdala and hypothalamus via the stria terminalis. *Histochemistry* 1980; **65**: 103–119.
- [69] ROSENBERG SB, COSS D, Mc GILLIVRAY BC, MELLON PL. Roles for SF-1 and NFY in the regulation of the mouse FSH β gene in L β T2 cells Program of the 84 th Meeting of The Endocrine Society. San Francisco, CA, 2002; p.187 (Abstract).
- [70] SAHU A, XU B, KALRA SP. Role of galanin stimulation of pituitary luteinizing hormone secretion as revealed by a specific receptor antagonist, galantide. *Endocrinology* 1994; **134**: 529–536.
- [71] SAUNDERS BD, SABBAGH E, CHIN WW, KAISER UB. Differential use of signal transduction pathways in the gonadotropin-releasing hormone-mediated regulation of gonadotropin subunit expression. *Endocrinology* 1998; **13**:1835–1843.
- [72] SHI Y, MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685–700.
- [73] SHODEBERK WE, ROBERSON MS, MAURER MA. Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene. *J Biol Chem* 1993; **268**: 3903–3910.
- [74] SHOGE K, MISHIMA HK, SAITOH T et al. Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Res* 1998; **809**: 127–136.
- [75] SKOTFISH G, JACOBOWITZ DM. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 1985; **6**: 509–546.
- [76] SMITH MJ, JENNES L, WISE PM. Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology* 2000; **141**: 4317–4319.
- [77] STANISLAUS D, JANOVICK JA, BROTHERS S, CONN PM. Regulation of G $_{q/11}$ α by the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 738–746.
- [78] STEGER DJ, HECHT JH, MELLON P. GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin α -subunit gene in the placenta and pituitary gland. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5592–5602.
- [79] STOBIE KM, WEICK RF. Effects of lesions of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei on the inhibition of pulsatile luteinizing hormone release by exogenous vasoactive intestinal peptide in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1990; **51**: 649–657.
- [80] STOBIE KM, WEICK RF. Vasoactive intestinal peptide inhibits luteinizing hormone secretion: the inhibition is not mediated by dopamine. *Neuroendocrinology* 1989; **49**: 597–603.
- [81] STRAHL BD, HUANG H-J, SEBASTIAN J, MILLER WL. Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating hormone β -subunit gene by gonadotropin-releasing hormone involvement of two activating-protein binding sites and protein kinase C. *Endocrinology* 1998; **139**: 4455–4465.
- [82] SUSZKO MI, LO DJ, SUH H et al. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone β -subunit promoter by activin. *Mol Endocrinol* 2003; **17**: 318–332.
- [83] SWIRNOFF AH, APEL ED, SVAREN J et al. NAB-1, a corepressor of NGFI-A (EGR-1), contains an active transcriptional expression domain *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 512–524.
- [84] TREMBLAY JJ, DROUIN J. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Pitx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2567–2576.
- [85] TREMBLAY JJ, LANCTOT C, DROUIN J. The pan-pituitary activator of transcription, Pitx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pitx1 and is upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx 3. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 428–441.
- [86] USDIN T, BONNER M, MEZEY E. Two receptors for vasoactive intestinal peptide with similar specificity and complementary distribution. *Endocrinology* 1994; **135**: 2662–2680.
- [87] VALE W, RIVIER C, HSUEH A et al. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Rec Prog Horm Res* 1988; **44**: 1–34.
- [88] Van der BEEK EM, HORVATH TL, WIEGANT VM et al. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 1997; **384**: 569–579.
- [89] Van der BEEK EM, WIEGANT VM, van der DONK HA et al. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol* 1993; **5**: 137–144.
- [90] VASILIJEV VV, PERNASETTI F, ROSENBERG SB et al. Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating beta gene by gonadotropin-releasing hormone involves multiple signal transduction pathways. *Endocrinology* 2002; **143**: 1651–1659.

- [91] WANG S, HASHEMI T, FRIED S et al. Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 receptor subtypes. *Biochemistry* 1998; **37**: 6711–6717.
- [92] WANG, JB, IMAI Y, EPPLER CM et al. μ -opiate receptors: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10230–10234.
- [93] WATTS AG, SWANSON LW. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 1987; **258**: 204–229.
- [94] WECK J, ANDERSON AC, JENKINS S et al. Divergent and composite gonadotropin-releasing hormone responsive elements in the rat luteinizing hormone subunit genes. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 472–485.
- [95] WECK J, FALLEST PC, PITT L, SHUPNIK MA. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 451–457.
- [96] WEICK RF, STOBIE KM, NOH KA. Effect of [4cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]VIP on the inhibition of pulsatile LH release by VIP and related peptides in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1992; **56**: 646–652.
- [97] WEICK RF, STOBIE KM. Role of VIP in the regulation of LH secretion in the female rat. *Neurosci Behav Rev* 1995; **19**: 251–259.
- [98] WOLFE MF, CALL GB. Early growth response protein binds to the luteinizing hormone β promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated gene expression. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 752–763.
- [99] YOKOI T, OHMICHU M, TASAKA K et al. Activation of the luteinizing hormone β promoter by gonadotropin-releasing hormone requires *c-Jun* N-terminal protein kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21639–21647.
- [100] YOSHINO M., MIZUTANI T, YAMADA K et al. Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 2002; **66**: 1813–1819.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 18.11.2005 r.

Przyjęto: 20.01.2006 r.

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN,

05-110 Jabłonna k. Warszawy

e-mail: a.gajewska@ifzz.pan.pl

SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W MIGRACJI KOMÓREK

THE PLASMINOGEN ACTIVATION SYSTEM IN CELL MIGRATION

Elżbieta JAKUBISZYN¹, Piotr DZIĘGIEL², Maciej ZABEL²

¹Dolnośląskie Centrum Onkologii oraz

²Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej, Wrocław

Streszczenie: Od kilku dziesięcioleci uważa się, że aktywacja plazminogenu może odgrywać ważną rolę w inwazji guza i przerzutowaniu. Podstawą jest założenie, że aktywatory plazminogenu uwolnione z komórek nowotworowych katalizują proteolityczną konwersję nieaktywnego plazminogenu do aktywnej proteinazy plazminy, która następnie katalizuje degradację białek w błonie podstawnej i macierzy pozakomórkowej (ECM), co ułatwia inwazję komórek nowotworowych do otaczających tkanek. Badania wykazały, że system aktywacji plazminogenu odgrywa także rolę w procesach związanych z nowotworową przebudową tkanek. Przykładem tego jest angiogeneza i desmoplazja, czyli stymulacja proliferacji fibroblastów i syntezy białek macierzy pozakomórkowej. W artykule omówiono budowę składników systemu aktywacji plazminogenu i ich rolę w adhezji, migracji i inwazji komórek nowotworowych, na podstawie wyników badań przeprowadzonych w hodowlach komórkowych. Następnie omówiono procesy zachodzące w guzie nowotworowym związane z systemem aktywacji plazminogenu i wpływ ekspresji poszczególnych składników na rokowanie w niektórych nowotworach u człowieka.

Słowa kluczowe: system aktywacji plazminogenu, migracja komórek, nowotwory.

Summary: For several decades, it has been assumed that plasminogen activation may play an important role in tumor invasion and metastasis. The basic idea is that plasminogen activators released from cancer cells catalyze the proteolytic conversion of the inactive zymogen plasminogen to the active proteinase plasmin, which in turn catalyzes degradation of proteins in basement membranes and extracellular matrix (ECM) and thus facilitates cancer cell invasion into the surrounding tissue. Studies have proved that plasminogen activation system also plays a role in processes connected with cancer cell-directed tissue remodelling. Examples of such processes are angiogenesis and desmoplasia, i.e. stimulation of fibroblast proliferation and extracellular matrix protein synthesis. In the text the structures of plasminogen activation system's elements and their role in cancer cells adhesion, migration and invasion based on experiments in cell culture model systems are described. Moreover, processes in cancer tumor involving plasminogen activation system and the role of components' expressions level in prognosis in selected human cancers are discussed.

Key words: plasminogen activation system, cell migration, cancer.

1. ELEMENTY SYSTEMU AKTYWACJI PLAZMINOGENU

System aktywacji plazminogenu wydaje się odgrywać istotną rolę w inwazji guza nowotworowego i przerzutowaniu. Dzieje się tak poprzez katalizowanie procesów proteolitycznych, degradację białek błony podstawnej i ECM, jak i udział w procesach nieproteolitycznych (np. inicjowanie kaskady wewnątrzkomórkowego przenoszenia sygnałów). System aktywacji plazminogenu uczestniczy również w nowotworowej przebudowie tkanek, która dotyczy komórek nienowotworowych, ale ma silny wpływ na wzrost guza nowotworowego i jego inwazję (angiogeneza, desmoplazja).

W skład systemu aktywacji plazminogenu wchodzi:

- plazminogen,
- plazmina,
- 2 typy aktywatorów plazminogenu, typ urokinazy (uPA) i typ tkankowy (tPA),
- receptor uPA (uPAR),
- 2 główne inhibitory aktywatorów plazminogenu: PAI-1 i PAI-2.

1.1. Plazminogen

Plazminogen jest proenzymem plazminy, o aktywności 10^4 do 10^6 mniejszej od plazminy. To jednołańcuchowe białko jest przekształcane do dwułańcuchowej plazminy przez proteolizę katalizowaną przez uPA lub tPA [4]. Plazminogen jest produkowany głównie w wątrobie, ale również w jądrach i komórkach naskórka. Receptory plazminogenu znajdują się na powierzchni różnych typów komórek, w tym monocytów krwi, granulocytów, limfocytów i komórek śródbłonna [18]. Interakcja plazminogenu z komórkowymi receptorami przyspiesza jego konwersję do plazminy, której aktywność enzymatyczna na powierzchni komórki jest wzmożona [1].

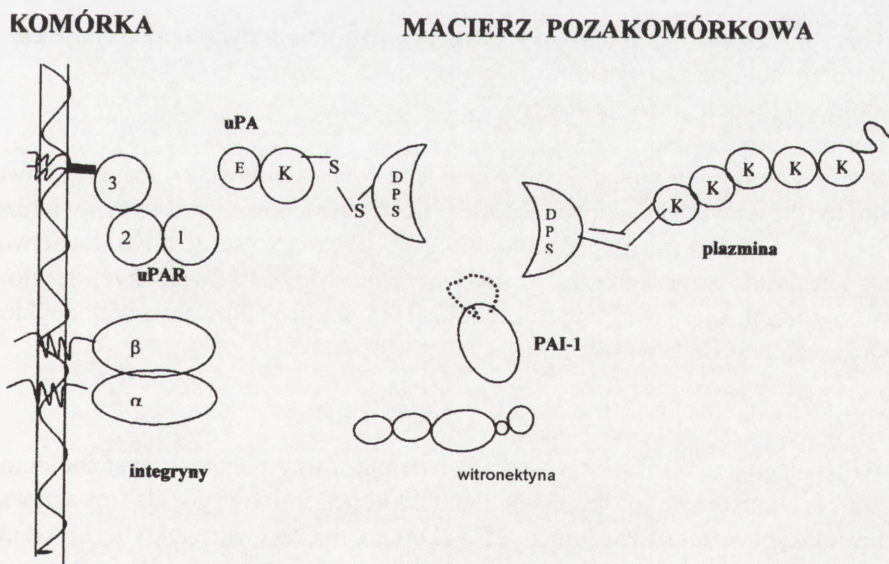
1.2. Plazmina

Plazmina jest to proteaza serynowa, składająca się z 2 łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Koniec aminowy łańcucha A zawiera 5 tzw. domen „kringle”. Koniec karboksylowy łańcucha B zawiera typową domenę proteazy serynowej, odpowiedzialną za jej właściwości katalityczne. Plazmina katalizuje hydrolizę wiązania peptydowego na końcu C między Lys i Arg [1,10]. Związana z powierzchnią komórki poprzez receptor plazmina katalizuje rozpad wielu substancji międzykomórkowych i cząsteczek błony podstawnej, takich jak: fibronektyna, laminina, witronektyna, fibryna i kolagen. Dochodzi do tego przez bezpośrednie działanie plazminy lub pośrednio przez aktywację zależnych od plazminy proteaz, takich jak pro-stromelizyny i prokolagenazy. Ponadto plazmina działa też na pojedyncze łańcuchy pro-uPA i uPA. Plazmina katalizuje również aktywację nieczynnej formy czynnika wzrostu TGF- β (*transforming growth factor- β*) i uwalnia bFGF (*basic fibroblast growth factor*) z miejsc jego połączenia z macierzą pozakomórkową. Plazmina może ponadto współuczestniczyć w aktywacji proenzymów metaloproteinaz macierzy (MMPs), których aktywacja prowadzi do dalszej degradacji i przebudowy ECM [10,17].

Angiostatyna, uważana za inhibitor angiogenezy, jest fragmentem plazminy, składającym się z „kringli” 1–3 lub 1–4. Angiostatyna zawiera przynajmniej jedną wolną grupę sulfhydrylową. *In vitro* wytwarzana jest z plazminogenu i plazminy przez elastazę trzustkową, metaloproteiny i przez autoproteolizę plazminy [1].

1.3. Aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA)

Aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA) jest proteazą serynową wytwarzaną jako jednołańcuchowe białko (pro-uPA). Po sekrecji pro-uPA jest przekształcany do aktywnej dwułańcuchowej formy uPA przez rozszczepienie łańcucha peptydowego przez plazminę [4, 10,27]. Pro-uPA jest proenzymem o znacznie mniejszej zdolności do aktywacji plazminogenu niż uPA. Wydzielany pro-uPA łączy się z uPAR (specyficzny receptor dla uPA), a następnie jest aktywowany przez plazminę do uPA, który z kolei przekształca sąsiadujący, związany z błoną plazminogen do plazminy. Dwa łańcuchy uPA są połączone mostkami dwusiarczkowymi, a każda cząsteczka zawiera 3 funkcjonalne domeny. W obszarze końca karboksylowego łańcucha B znajduje się domena proteazy serynowej z pełną specyficzną aktywnością. Fragment końca aminowego łańcucha A, zawiera tzw. domenę „kringle”, która łączy białka oraz domenę GF podobną do naskórkowego czynnika wzrostu, a także obszar łączący. Tym samym cząsteczka uPA ma przynajmniej dwie całkowicie niezależne części: katalityczny łańcuch końca karboksylowego (domena proteazy serynowej) i niekatalityczny łańcuch końca aminowego, którego początkowa GF domena jest odpowiedzialna za specyficzne interakcje z uPAR [3,10]. Proteolityczne



RYCINA 1. Schematyczny rysunek składników systemu aktywacji plazminogenu i współdziałających z nim elementów okołokomórkowych

rozszczenie uPA w obszarze łączącym powoduje powstanie fragmentu aminoterminalnego (ATF) tzn. domeny GF i domeny „kringle” oraz małowcząsteczkowej formy uPA (*low molecular-weight uPA* – LMW-uPA) tzn. domeny proteazy serynowej i części łącznika [1,20].

Aktywność uPA jest kontrolowana przez PAI (specyficzny inhibitor) i internalizację. Oprócz plazminogenu, uPA bezpośrednio katalizuje konwersję nieaktywnej jednołańcuchowej formy czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) i białka stymulującego makrofagi (MSP) do ich aktywnych form dwułańcuchowych. HGF i MSP mają sekwencję podobną do plazminy, ale są pozbawione aktywności proteolitycznej i działają przez połączenie się z receptorem typu kinazy tyrozynowej [20]. uPA jest produkowany przez nerki. Do fizjologicznych zjawisk, w których bierze udział uPA, należą: rozerwanie pęcherzyka jajnikowego podczas owulacji i implantacja blastocysty, inwolucja gruczołu piersiowego po laktacji, inwolucja prostaty po kastracji, gojenie ran [20]. Procesy te są w pewnym sensie podobne do inwazji raka, gdyż wiążą się z destrukcją błony podstawnej.

1.4. Aktywator plazminogenu typu tkankowego (tPA)

Aktywator plazminogenu typu tkankowego (tPA) jest białkiem wydzielanym przez komórki jako jednołańcuchowy prekursor. Plazmina przekształca prekursor przez rozszczenie wiązania peptydowego do aktywnej dwułańcuchowej formy. Łańcuchy są połączone pojedynczym wiązaniem dwusiarczkowym. Odmienne niż w uPA pojedynczy łańcuch tPA ma także znaczną aktywność (ale ok. 10 do 50 razy niższą niż forma dwułańcuchowa). Cząsteczka tPA składa się z czterech czynnościowo różnych domen:

- 1) końca aminowego znanego jako domena podobna do fibronektyny lub domena palca,
- 2) domeny podobnej do naskórkowego czynnika wzrostu,
- 3) domeny dwóch „kringle” (K1, K2),
- 4) domeny proteazy serynowej.

Trzy pierwsze domeny znajdują się w łańcuchu końca aminowego i mają właściwości modulujące dla enzymu [1]. Obecność specyficznych receptorów dla tPA stwierdzono m.in. w hepatocytach, mózgu, śródbłonku [20]. tPA ma wysokie powinowactwo do fibryny i jest aktywowany przez jej przyłączenie. Może to świadczyć, że główna biologiczna rola tPA jest związana z fibrynolizą. tPA jest produkowany przez śródbłonek naczyń i uwalniany do krwi.

1.5. uPAR (receptor uPA)

uPAR (receptor uPA) jest cząsteczką, zawierającą trzy bogate w cysteinę domeny połączone krótkim obszarem łączącym. Domena końca aminowego (D1) ma aktywność wiązania uPA; pozostałe dwie domeny (D2 i D3) przyłączają witronektynę. uPAR może też przyłączać integryny, w miejscach odmiennych od miejsc łączenia uPA i witronektyny [4,20]. Uważa się, że uPAR może być modulatorem funkcji integryn. uPAR łączy się z błoną komórkową przez kotwicę glikozylo-fosfatydylo-inozytolową [1]. Pro-uPA i uPA mają takie same powinowactwo do łączenia z uPAR. uPAR łączy się z domeną podobną do naskórkowego czynnika wzrostu (domena GF) cząsteczki uPA.

1.6. Inhibitory aktywatorów plazminogenu

Inhibitory aktywatorów plazminogenu (PAI) należą do rodziny inhibitorów proteazy serynowej (SERPIN) do podgrupy zawierającej argininę w reaktywnym centrum (arg-SERPIN) [1]. Wyróżniamy dwa inhibitory: PAI-1 i PAI-2.

1.6.1. PAI-1

PAI-1 jest jednołańcuchową glikoproteiną wydzielaną przez wiele typów komórek (m.in. płytki krwi, komórki śródbłonna, komórki guza). Oprócz roli bezpośredniej inaktywacji aktywatorów plazminogenu (reaguje zarówno z uPA, jak i tPA), PAI-1 związany w macierzy pozakomórkowej moduluje okołokomórkową proteolizę, wywołaną przez uPA związany z receptorem. PAI-1 bierze także udział w regulacji adhezji i migracji komórkowej, łącząc się z białkiem ECM – witronektyną [10,27].

1.6.2. PAI-2

PAI-2 jest jednołańcuchowym białkiem wytwarzanym m.in. przez monocyty, komórki trofoblastyczne, komórki guza. PAI-2 jest obecny w dużej ilości w osoczu kobiet ciężarnych. Jego właściwości inhibicyjne są 15 razy mniejsze niż PAI-1. Ogólnie PAI-2 określa się jako inhibitor pozakomórkowej proteazy serynowej uPA. Jednakże, większość nowosyntezowanego PAI-2 pozostaje wewnątrz komórki. Ostatnio postuluje się wewnątrzkomórkową rolę PAI-2 na podstawie obserwacji, że cytoplazmatyczna ekspresja PAI-2 chroni komórki przed apoptozą, w której pośredniczy TNF- α . PAI-2 może występować w dwóch formach: wydzielniczej i cytozolowej. Forma wydzielnicza uczestniczy w kontroli przebudowy tkankowej i w fibrynolizie. Forma cytozolowa gra ważną rolę w wewnątrzkomórkowej proteolizie w takich procesach, jak apoptoza i zapalenie [10,20].

1.7. Inne cząsteczki związane z systemem aktywacji plazminogenu

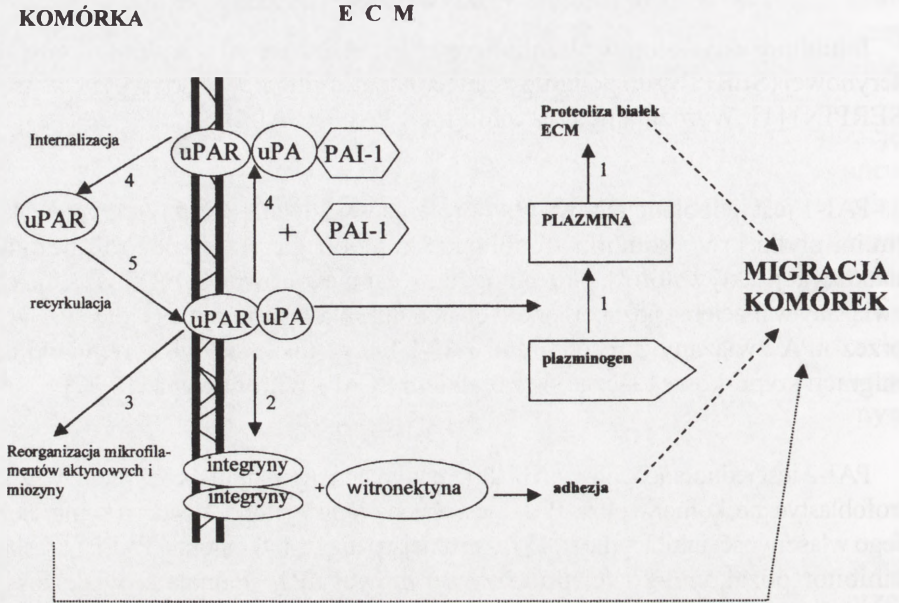
W procesach adhezji i migracji komórek składniki systemu aktywacji plazminogenu współdziałają z innymi cząsteczkami. Należą do nich: witronektyna i integryny.

1.7.1. Witronektyna

Witronektyna jest glikoproteiną obecną w osoczu krwi i pozanaczyniowo w macierzy pozakomórkowej. Przyczynia się ona do adhezji i rozprzestrzeniania się komórek. Koniec N witronektyny (domena somatomedyny B) łączy się zarówno z PAI-1, jak i uPAR, które konkurują ze sobą o przyłączenie [6]. Witronektyna przyłącza się również do integryn, obecnych w błonie komórkowej, które współzawodniczą o łączenie z PAI-1. Łączenie to następuje w miejscu sekwencji RGD (linijna sekwencja arginina-glicyna-asparaginian /Arg-Gly-Asp/) [1].

1.7.2. Integryny

Integryny są rodziną transbłonowych glikoprotein. Zbudowane są z łańcuchów α i β . Należą do cząsteczek odpowiedzialnych za adhezję komórek. Do ligandów integryn w macierzy pozakomórkowej należą wiele cząsteczek, np. kolagen, laminina, fibronektyna, witronektyna. Integryny łączy się z tymi cząsteczkami w miejscu sekwencji



RYCINA 2. Przyłączenie pro-uPA do jego receptora uPAR powoduje aktywację pro-uPA do uPA. Kompleks uPA-uPAR (1) powoduje przejście plazminogenu w aktywną plazminę, która proteolizuje białka ECM; (2) moduluje funkcję integrzyn umożliwiając im wiązanie się z niektórymi składnikami ECM, np. witronektyna; (3) aktywuje procesy wewnątrzkomórkowe mające wpływ na reorganizację mikrofilamentów aktywnych i miozyny. Wszystkie te trzy procesy umożliwiają migrację komórek. W przypadku komórek nowotworowych prowadzi to do naciekania podścieliska i umożliwia przerzutowanie. Przyłączenie PAI-1 do kompleksu uPA-uPAR powoduje inaktywację kompleksu i prowadzi do jego internalizacji (4). Część uPAR może podlegać recyrkulacji i powracać do błony komórkowej (5)

RGD. Wewnątrzkomórkowo integrzyny łączą się poprzez układ wielu białek z mikrofilamentami aktywnymi. To połączenie integrzyn, poza- i wewnątrzkomórkowo, umożliwia poruszanie się komórki dzięki systemowi mikrofilamentów aktywnych i miozynowych przy jednoczesnym umocowaniu w macierzy pozakomórkowej.

2. SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W HODOWLACH KOMÓRKOWYCH

Łączenie z uPAR powoduje akumulację pro-uPA i uPA na powierzchni komórek. Badania immunocytochemiczne na hodowlach komórkowych wykazały, że uPAR i jego kompleksy z pro-uPA i uPA gromadzą się często w specyficznych miejscach – obszarze kontaktu komórek z podłożem. W czasie migracji komórek uPAR zwykle ulega koncentracji na prowadzącym brzegu komórki. Tym samym lokalizacja uPAR wydaje się mieć charakter dynamiczny. Aktywacja pro-uPA związanego z uPAR na powierzchni komórki przebiega dużo szybciej niż aktywacja niezwiązanego pro-uPA.

Aktywny uPA związany z uPAR na powierzchni komórki katalizuje aktywację plazminogenu dużo bardziej wydajnie niż niezwiązany uPA. To wzmocnienie aktywacji pro-uPA i aktywacji plazminogenu przez uPA wydaje się być spowodowane przez akumulację plazminogenu na powierzchni komórki. Najbardziej oczywistą konsekwencją okołokomórkowego wytwarzania plazminy jest degradacja fibryny i innych białek macierzy pozakomórkowej [1].

W hodowlach komórkowych PAI-1 jest związany z witronektyną w podłożu. Połączenie PAI-1 z witronektyną może chronić witronektynę przed degradacją spowodowaną przez uPA.

Dużo uwagi poświęca się przypuszczeniu, że kompleks uPA-uPAR może aktywować wewnątrzkomórkową kaskadę przenoszenia sygnałów, bez wytwarzania plazminy. Proces zostaje zainicjowany przez przyłączenie uPA do uPAR, co aktywuje różne kinazy i dalej czynniki transkrypcyjne, które z kolei mogą wpływać poprzez aktywację syntezy odpowiednich białek na strukturę cytoszkieletu, adhezję komórek i ich migrację [10,20]. Kompleks uPAR-uPA reaguje z PAI-1; następnie może ulegać internalizacji, czyli endocytozie kompleksów [2,10]. Do endocytozy dochodzi przez przyłączenie kompleksu do receptorów endocytozy z rodziny LDLR (receptorów lipoproteinowych o małej gęstości). uPAR podlega recyrkulacji i może powracać na powierzchnię komórki [1,10,27].

Klasyczną rolą plazminogenu jest przeciwdziałanie adhezji komórka-podłoże i komórka-komórka, ponieważ okołokomórkowe powstanie plazminy prowadzi do degradacji receptorów adhezji i ich ligandów w macierzy pozakomórkowej.

W regulacji adhezji komórek może mieć też udział zainicjowanie kaskady sygnałów wewnątrzkomórkowych przez kompleks uPA-uPAR oraz regulacja funkcji integryn przez ten kompleks, do której prawdopodobnie dochodzi przez bezpośredni pozakomórkowy kontakt uPAR-integryny [1]. uPAR może być również receptorem adhezji, gdyż ma zdolność łączenia witronektyny. Proces ten jest stymulowany przez uPA, którego przyłączenie do uPAR powoduje zmiany przestrzenne w jego strukturze, eksponując miejsce wiązania z witronektyną, czyli uPA stymuluje łączenie uPAR-witronektyna [20].

2.1. Migracja komórek

Migracja komórek jest definiowana jako poruszanie się komórek przez podłoże macierzy pozakomórkowej, obejmuje jej rozciągnięcie i przyłączenie integryn lub innych receptorów adhezji do ich ligandów w macierzy (takich jak witronektyny) przy prowadzącym brzegu komórki. Adhezja komórka-macierz przy jej brzegu prowadzącym daje siłę napędową do pociągnięcia komórki do przodu, siła mechaniczna jest wytwarzana przez układ aktyna-miozyna. Rozszczepienie kompleksu integryny/ligand umożliwia retrakcję pozostającej części komórki [1].

uPA może stymulować migrację komórek drogą proteolityczną i nieproteolityczną. W pierwszym przypadku ma to miejsce przez katalizowanie wytwarzania plazminy, która powoduje degradację białek macierzy pozakomórkowej i receptorów adhezji, co ułatwia uwalnianie pozostającej części komórki [3].

W przypadku stymulacji nieproteolitycznej efekt ten może zależeć od wzmocnienia przez uPA adhezji na brzegu prowadzącym komórki przez stymulację łączenia uPAR-

witronektyna [3], od aktywacji kaskady wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów w prowadzącym brzegu komórki [20] oraz od regulacji aktywności łączenia integrzyn. Do stymulacji może też dochodzić przez wiązanie z PAI-1, co powoduje uwolnienie jego połączenia z witronektyną i znosi jego inhibicję w stosunku do łączenia integrzyn i witronektyny [1,3].

PAI-1 może wpływać hamująco lub stymulująco na migrację komórek. Zależy to od hamującego wpływu PAI-1 na wiązanie integrzyn z witronektyną i relatywnego udziału tego wiązania w migracji komórek [5]. PAI-1 może też hamować migrację komórek przez inhibicję katalizowanego przez uPA wytwarzania plazminy [3].

2.2. Inwazja komórek w hodowlach komórkowych

Różne badania w hodowlach komórkowych wykazały, że wytwarzanie plazminy, katalizowane przez połączenie uPA z uPAR na powierzchni komórek inwazyjnych jest czynnikiem wpływającym na szybkość inwazji w wielu typach komórek. Badania te wykonano przy użyciu testów oceniających inwazję w hodowlach komórkowych, takich jak np. test na inwazję w izolowanej ludzkiej błonie owodniowej, w żelu fibrynowym i kolagenowym i w innych rodzajach odtworzonej ECM (tzw. Matrigel). Obserwowano, że PAI-2 zawsze hamuje inwazję. Obserwacje dotyczące PAI-1 są bardziej różnorodne. Ta niejednorodność obserwowanych efektów działania PAI-1 może mieć związek z inhibującym wpływem na inwazję nadmiernej aktywacji plazminogenu. Mimo że wysoki poziom PAI-1 może chronić macierz pozakomórkową przed proteolizą zależną od aktywacji plazminogenu i w ten sposób hamować inwazję, to niski poziom PAI-1 może być potrzebny do ochrony białek macierzy pozakomórkowej niezbędnych do migracji komórek. Wpływ PAI-1 na inwazję wydaje się być zależny od ekspresji innych składników systemu aktywacji plazminogenu w komórkach inwazyjnych, od receptorów endocytozy, integrzyn i składu macierzy pozakomórkowej [1].

3. SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH I PATOFIZJOLOGICZNYCH NIENOWOTWOROWYCH – BADANIA NAD MYSZAMI Z BRAKAMI SPECYFICZNYCH GENÓW

Badania te wykazały, że u myszy plazminogen *-/-* oraz u myszy uPA $-/-$ i tPA $-/-$ powstają rozsiane złogi fibryny wewnątrz- i pozanaczyniowo, powodując rozległe uszkodzenia narządów, niską wagę ciała i krótki czas życia. Dlatego uważa się, że fibrynoliza może być krytyczną i być może jedyną istotną fizjologiczną funkcją aktywacji plazminogenu [1]. U myszy uPA $-/-$ i myszy plazminogen *-/-* stwierdzono upośledzoną rekrutację leukocytów do miejsca infekcji. uPA i jego prekursorzy mogą stymulować chemotaksję różnych typów komórek, np. leukocytów, neutrofilów i makrofagów [1]. U myszy uPA $-/-$ w ciągu pierwszych trzech dni życia naskórek proliferuje znacznie wolniej niż naskórek normalnej myszy. Proliferacja normalizuje się do 5 dnia życia, a potem stopniowo zmniejsza

się z wiekiem, podobnie jak u myszy normalnej, do bardzo niskiego poziomu charakterystycznego dla dojrzalego naskórka. Dla kontrastu naskórek myszy tPA^{-/-} wykazuje normalną proliferację w każdym okresie życia. Mechanizm, w którym uPA promuje proliferację naskórka, nie jest jasny. Jedną z możliwości jest, że uPA łącząc się z receptorem uPAR stymuluje transdukcję sygnałów. Inna hipoteza zakłada, że następuje odszczepienie czynnika wzrostu hepatocytów, który jest mitogenem dla keratynocytów. HGF jest przekształcany do swojej aktywnej formy bezpośrednio przez uPA [22].

Wyniki tych obserwacji ukazują, że system aktywacji plazminogenu może pełnić fizjologiczne role niezwiązane z fibrynolizą.

4. SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W EKSPERYMENTALNYM TWORZENIU PRZERZUTÓW U ZWIERZĄT

Wiele eksperymentów na zwierzętach wykazało, że wytwarzanie plazminy katalizowane przez uPA odgrywa istotną rolę w procesie tworzenia przerzutów. Aby ułatwiać ten proces, uPA musi być związane z uPAR.

Ekspresja PAI-2 w komórkach raka hamuje tworzenie przerzutów [1]. Brak spójnych wyników dotyczących PAI-1. Istnieją badania wykazujące upośledzenie zdolności przerzutowania po iniekcji zwierzętom PAI-1, jak i takie, które wykazują udział PAI-1 w inwazji komórek raka i angiogenezie.

Angiostatyna hamuje wzrost guza pierwotnego i tworzenie przerzutów u zwierząt przez inhibicję angiogenezy guza, która następuje przez hamowanie migracji komórek śródbłonna i ich proliferacji [1].

5. PROCESY ZACHODZĄCE W GUZIE NOWOTWOROWYM ZWIĄZANE Z SYSTEMEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU

Sytuacja w guzie *in vivo* jest dużo bardziej skomplikowana niż w hodowlach komórkowych, służących do badania roli systemu w migracji komórek i inwazji. W guzie nie tylko komórki nowotworowe, ale też komórki niezłośliwe mają właściwości migracyjne i inwazyjne, co jest związane z procesem przebudowy tkanek wywołanym przez komórki raka. System aktywacji plazminogenu może uczestniczyć we wroście guza, inwazji i tworzeniu przerzutów biorąc udział w takich właśnie procesach. W celu zidentyfikowania procesów zachodzących w guzie, w których uczestniczy system aktywacji plazminogenu, stosuje się immunohistochemię i hybrydyzację *in situ*, uwidaczniając komórki wykazujące ekspresję poszczególnych składników systemu. Ograniczeniem takich badań jest fakt, że niekoniecznie musi istnieć korelacja między ilością określonego białka w określonym miejscu i jego funkcjonalnym znaczeniem w tej lokalizacji. Wyniki poszczególnych badań różnią się między sobą. Jednak ogólną

regułą jest, że każdy z elementów systemu wykazuje ekspresję nie tylko w jednym typie komórek i że wzory ekspresji w różnych typach guzów są odmienne. Lokalizacja poszczególnych elementów może się różnić w poszczególnych guzach w tej samej tkance, zależnie od stopnia ich zróżnicowania [1].

Obecność elementów systemu aktywacji plazminogenu w komórkach raka sugeruje ich funkcję w migracji i inwazji komórek raka, ich obecność w fibroblastach podścieliska – ich rolę w desmoplazji i przebudowie podścieliska, natomiast obecność w komórkach śródbłonna – rolę w angiogenezie.

Różna ekspresja PAI-1 przez różne typy komórek i w różnych typach tkanek może być związana z zależną od nowotworu przebudową tkanek, przez umożliwienie odkładania nowej macierzy pozakomórkowej, np. podczas angiogenezy, w obszarach tkanek o dużej aktywności uPA [1].

6. EKSPRESJA ELEMENTÓW SYSTEMU AKTYWACJI PLAZMINOGENU W GUZIE I ROKOWANIE CHORYCH

Ekspresja uPA, PAI-1 i uPAR w złośliwych guzach u człowieka jest znacząco wyższa niż w odpowiadających im tkankach normalnych [13], jednak ich ekspresja w określonym typie guza różni się znacząco między poszczególnymi pacjentami.

U chorych z dużą ekspresją uPA w komórkach guza stwierdzono krótszy czas wolny od choroby i krótszy całkowity czas przeżycia w porównaniu z chorymi, u których ta ekspresja była niska. Niekorzystna rokowniczo wydaje się być również wysoka ekspresja PAI-1 i uPAR. Odwrotnie, ekspresja tPA korelowała z dobrym rokowaniem [7].

Wysoki poziom ekspresji uPA obserwowano zarówno w ludzkich guzach, jak i liniach komórkowych z raków pęcherza, piersi, płuca [17], prostaty [12], jelita grubego [2,15], jajnika [25,29] i płaskonabłonkowym raku jamy ustnej [16]. Podwyższona ekspresja uPA i PAI-1 w rakach jajnika i piersi korelowała z większą inwazyjnością, częstością wznów, krótszym czasem przeżycia [6,25,26,27,29]. W raku piersi wykazującym wysoką ekspresję uPA obserwowano zwiększone ryzyko wczesnych wznów i złe rokowanie ze względu na wczesne przerzuty [6,9,11,24]. Podobnie gorsze rokowanie miały chore na raka piersi z niską ekspresją tPA [7]. W raku piersi *in situ* (DCIS) wysoka ekspresja uPAR znacząco korelowała z nawrotem choroby [14]. Progresa guza i wznowy związane były z wysoką ekspresją uPA w raku pęcherza.

PODSUMOWANIE

Hipoteza, że aktywacja plazminogenu jest czynnikiem ograniczającym inwazję guza i tworzenie przerzutów, znalazła potwierdzenie w wielu badaniach *in vitro* i *in vivo*. Rosnąca wiedza na ten temat wykazała, że system działa w sposób dużo bardziej skomplikowany, niż zakładano. Wiele wyników sugeruje, że oprócz funkcji zależnych od plazminy (tj. degradacji białek błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej, co

ułatwia inwazję komórek nowotworowych do otaczających tkanek), system aktywacji plazminogenu pełni też funkcje niezależne od plazminy. Na funkcje te składa się: inicjowanie przez połączenie uPA z uPAR kaskady wewnątrzkomórkowego przenoszenia sygnałów; działanie uPAR jako receptora witronektyny i regulatora funkcji integrzyn; działanie PAI-1 jako regulatora uPAR i łączenia integrzyn z witronektyną; interakcje z receptorami endocytozy.

Dynamiczny stan systemu umożliwia przestrzenną i czasową reorganizację jego składników na powierzchni komórek podczas ich migracji i inwazji. Co więcej, staje się pewne, że system spełnia wiele funkcji w biologii guza. Wydaje się, że odgrywa rolę nie tylko w migracji i inwazji komórek raka, ale i w przebudowie otaczających tkanek. Przykładem takich procesów jest angiogeneza i desmoplazja, czyli stymulacja proliferacji fibroblastów i syntezy białek macierzy pozakomórkowej. Procesy te, mimo że obejmują migrację i inwazję komórek nienowotworowych, mają silny wpływ na wzrost guza i inwazję, co może mieć duże znaczenie w całym procesie przerzutowania.

Specjalny problem istnieje w rozumieniu roli PAI-1 w biologii guza. Nieoczekiwane obserwacje, że PAI-1 jest markerem złej prognozy, stało się bodźcem do wielu badań, jednak nie wypracowano jednolitej hipotezy o roli PAI-1.

Niektóre obserwacje wskazują, że PAI-1 może przeciwdziałać migracji i inwazji przez hamowanie uPA, chroniąc macierz pozakomórkową przed proteolizą zależną od aktywacji plazminogenu i w ten sposób hamować inwazję. Inne popierają hipotezę, że PAI-1 jest niezbędny dla optymalnego działania systemu w tych procesach przez regulację adhezji komórek i ograniczanie proteolizy w czasie i w przestrzeni.

Ostatnie wyniki sugerują, że PAI-1, którego ekspresję wykazano w komórkach nienowotworowych, odgrywa rolę we wzroście guza i jego rozprzestrzenianiu przez ochronę nowej macierzy pozakomórkowej, powstałej podczas przebudowy tkanek, np. podczas angiogenezy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDREASEN PA, EGELUND R, PETERSEN HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *CMLS, Cell Mol Live Sci* 2000; **57**: 25–40.
- [2] BAKER EA, LEAPER DJ. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 981–988.
- [3] BLASI F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunology Today* 1997; **18**: 415–417.
- [4] BLASI F, VASSALLI JD, DANO K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol* 1987; **104**: 801–804.
- [5] CHAZAUD B, RICOUX R, CHRISTOV C, PLONQUET A, GHERARDI RK, BARLOVATZ-MEIMON G. Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *Am J Pathol* 2002; **160**: 237–246.
- [6] CIANFROCCA M, GOLDSTEIN LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist* 2004; **9**: 606–616.
- [7] CORTE MD, VEREZ P, RODRIGUEZ JC, ROIBAS A, DOMINGUEZ ML, LAMELAS ML, VAZGUEZ J, MUNIZ JLG, ALLENDE MT, GONZALEZ LO, FUEYO A, VIZOSO F. Tissue-type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat* 2005; **90**: 33–40.

- [8] DENG A, CURRIDEN S.A., WANG S, ROSENBERG S, LOSKUTOFF DJ. Is Plasminogen Activator Inhibitor-1 the Molecular Switch That Governs Urokinase Receptor-mediated Cell Adhesion and Release? *J Cell Biol* 1996; **134**: 1563–1571.
- [9] DUBLIN E, HANBY A, PATELN K, LIEBMAN R, BARNES D. Immunohistochemical Expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in Breast Carcinoma. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1219–1227.
- [10] DUFFY MJ, DUGGAN C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clinical Biochemistry* 2004; **37**: 541–548.
- [11] FOEKENS JA, PETERS HA, LOOK MP, PORTENGEN H, SCHMITT M, KRAMER MD, BRUNNER N, JANICKE F, MEIJER-VAN GELDER ME, HENZEN-LOGMANS S, VAN PUTTEN WLJ, KLIJN JGM. The Urokinase System of Plasminogen Activation and Prognosis in 2780 Breast Cancer Patients. *Cancer Res* 2000; **60**: 636–643.
- [12] GAVRILOV D, KENZIOR O, EVANS M, CALALUCE R, FOLK WR. Expression of urokinase plasminogen activator and receptor in conjunction with the *ets* family and AP-1 complex transcription factors in high grade prostate cancers. *Eur J Cancer* 2001; **37**: 1033–1040.
- [13] GHISO JAA, ALONSO DF, FARRIAS EF, GOMEZ DE, BAL DE KIER JOFFE E. Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 295–304.
- [14] GUYTON DP, EVANS DM, SLOAN-STAKLEFF KD. Urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR): A Potential Indicator of Invasion for *in situ* Breast Cancer. *The Breast Journal* 2000; **6**: 130–136.
- [15] HARVEY SR, SAIT SNJ, YAN XU, BAILEY JL, PENETRANTE RM, MARKUS G. Demonstration of Urokinase Expression in Cancer Cells of Colon Adenocarcinomas by Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization. *AJP* 1999; **155**: 1115–1120.
- [16] HUNDDSDORFER B, ZEILHOFER HF, BOCK KP, DETTMAR P, SCHMITT M, HORCH HH. Comparison of urokinase-type plasminogen activators (uPA) and plasminogen activator inhibitors (PAI-1) in primary resection of oral squamous cell carcinoma. *Mund Kiefer Gesichtsschir* 2004; **8**: 180–190.
- [17] HE CH, HE P, LIU LP, ZHU YS. Analysis of expressions of components in the plasminogen activator system in high- and low-metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; **127**: 180–186.
- [18] HILDENBRAND R, GLIENKE W, MAGDOLEN V, GRAEFF H, STUTTE HJ, SCHMITT M. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 1998; **110**: 27–32.
- [19] HILDENBRAND R, LEITZ M, MAGDOLEN V, LUTHER T, ALBRECHT S, GRAEFF H, STUTTE HJ, BLEYL U, SCHMITT M. Validation of immunolocalization of the urokinase receptor expression in ductal carcinoma *in situ* of the breast: comparison with detection by non-isotopic *in-situ* hybridization. *Histopathology* 2000; **36**: 499–504.
- [20] IRIGOYEN JP, MUNOZ-CANOVES P, MONTERO L, KOZICZAK M, NAGAMINEY. The plasminogen activator system: biology and regulation. *CMLS, Cell Mol Live Sci* 1999; **56**: 104–132.
- [21] ITOH T, HAYASHI Y, KANAMARU T, MORITA Y, SUZUKI S, WANG W, ZHOU L, RUI JA, YAMAMOTO M, KURODA Y, ITOH H. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterology and Hepatology* 2000; **15**: 422–430.
- [22] JENSEN P, LAVKER RM. Urokinase is a Positive Regulator of Epidermal Proliferation *in vivo*. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 240–244.
- [23] LANZA F, CASTOLDI GL, CASTAGNARI B, TODD III RF, MORETTI S, SPISANI S, LATORRACA A, FOCARILE E, ROBERTI MG, TRANIELLO S. Expression and functional role of urokinase-type plasminogen activator receptor in normal and acute leukaemic cells. *Brit J Haematol* 1998; **103**: 110–123.
- [24] LOOK MP, van PUTTEN WL, DUFFY MJ, HARBECK N, CHRISTENSEN IJ, THOMSSSEN C. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 116–128.
- [25] O TOOLE S, MCGUINNESS E, SHEPPARD B, BONNAR J. Plasminogen activators and inhibitors in ovarian adenocarcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 1999; **9**: 61–66.
- [26] PEDERSEN AN, CHRISTENSEN IJ, STEPHENS RW, BRIAND P, MOURIDSEN HT, DANOK, BRUNNER N. The Complex between Urokinase and Its Type-1 Inhibitor in Primary Breast Cancer: Relation to Survival. *Cancer Res* 2000; **60**: 6927–6934.
- [27] PEDERSEN AN, MOURIDSEN HT, TENNEY DY, BRUNNER N. Immunoassays of urokinase (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in detergent extracts of breast cancer tissue. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 899–908.

- [28] ROMER J, PYKE CH, LUND LR, RALFKIAER E, DANO K. Cancer Cell Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor mRNA in Squamous Cell Carcinomas of the Skin. *J Invest Dermatol* 2001; **116**: 353–358.
- [29] TECIMER C, DOERING DL, GOLDSMITH LJ, MEYER JS, ABDULHAY G, WITTLIFF JL. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor type 1 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2000; **10**: 372–381.
- [30] THEWES M, ELSNER E, WESSNER D, ENGST R, RING J. The urokinase plasminogen activator system in angiosarcoma, granuloma pyogenicum, and angioma: an immunohistochemical study. *Internat J Dermatol* 2000; **39**: 188–191.
- [31] ZHOU L, HAYASHI Y, ITOH T, WANG W, AN RUI J, ITOH H. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in hepatocellular carcinoma. *Pathology Internat* 2000; **50**: 392–397.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.11.2005 r.

Przyjęto: 10.01.2006 r.

53-644 Wrocław, ul. Zachodnia 14/9

e-mail: elzbieta.jak@wp.pl

WYBRANE MECHANIZMY NABYWANIA ODPORNOŚCI ORGANIZMÓW NA ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN

CHOSEN MECHANISMS OF ACQUIRING ORGANISMS' RESISTANCE
TOWARDS PESTICIDES

Katarzyna NOWACZYK, Aleksandra OBREPALSKA-STEPLOWSKA

Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Ochrony Roślin
w Poznaniu

Streszczenie: Wystąpienie odporności jest naturalną konsekwencją zachodzących nieprzerwanie procesów ewolucyjnych wywołanych presją selekcyjną. W przypadku stosowania środków ochrony roślin presją tą są pestycydy, wykorzystywane w celu zapobiegania stratom w uprawach, spowodowanym przez patogeny, szkodniki itp. Wykształcanie przez agrofagi odporności na te preparaty jest zjawiskiem stosunkowo częstym, pojawiającym się nawet po krótkim czasie kontaktu z substancją czynną. Nabycie odporności jest najczęściej skutkiem mutacji punktowych, wpływających na zmianę struktury białek docelowych dla działania pestycydów, czy powodujących zmianę funkcjonalną innych białek (np. enzymatycznych), lub też zwiększonej ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za detoksykację substancji czynnej. Zarówno mechanizmy działania biocydów, jak i nabywania na nie odporności stanowią bardzo szerokie zagadnienie, w związku z czym w niniejszej pracy omówione zostały wybrane mechanizmy molekularne, wpływające na pojawienie się odporności na środki ochrony roślin. Podane przykłady dotyczą najczęściej występujących szkodników i patogenów roślinnych – owadów, grzybów i patogenicznych bakterii, a także chwastów.

Słowa kluczowe: odporność, biocydy, patogeny roślin, szkodniki.

Summary: Pests and plant pathogens are important reason of crops' quality and productivity limitation. Chemical drugs and pesticides belong to the most common among the strategies used to restrict losses in agricultural production. However, agrophags frequently acquire the resistance towards these substances, even after short time of contact with them. The occurring resistance is a natural consequence of the continuous evolutionary processes influenced by the selective pression of pesticides. The resistance results from point mutations and, in consequence, the changes of target protein's structure for pesticides or the functional changes of other proteins, for example enzymes. The matter of the mechanisms of pesticides' action and the formation of resistance is very extensive, therefore in this paper only chosen molecular mechanisms, that influence the occurrence of resistance towards pesticides are discussed. Given examples had been restricted to the most common pests and plant pathogens – insects, fungi, pathogenic bacteria, as well as herbs.

Key words: resistance, biocides, plant pathogens, pests.

WSTĘP

Ciągły i szybki wzrost populacji ludzkiej wymaga nieustannego zwiększania produkcji żywności, a zwłaszcza jej wydajności. Jednym ze sposobów jest ograniczenie rozprzestrzeniania się szkodników roślin, powodujących wraz z chorobami ok. 60% strat w produkcji roślinnej. Stosowane w ostatnich latach strategie ochrony roślin polegały głównie na krótkoterminowych interwencjach wykorzystujących pojedynczo dostępne na rynku technologie, szczególnie chemiczne pestycydy. Nie prowadzono badań nad możliwym współdziałaniem różnych technologii i ich kompatybilnością. Doświadczenia ostatnich lat pokazują, że im większą kontrolę udaje się uzyskać nad patogenami roślin w wyniku działań krótkoterminowych, tym większe prawdopodobieństwo poważnego załamania równowagi w poddanych im ekosystemach. Szkodniki zawsze wpływały na spadek wydajności produkcji, jednak wiele z zaistniałych obecnie problemów wynika z działań podjętych w celu ochrony roślin [39]. Jednym z takich problemów jest pojawienie się odporności u patogenów i szkodników roślinnych na stosowane przeciw nim środki.

Biocydy (ksenobiotyki) to substancje lub mieszaniny substancji przeznaczone do zwalczania chwastów, szkodników i patogenów roślin. Są to zwykle związki organiczne lub mineralne, toksyczne w określonych stężeniach dla każdej żywej komórki [28]. Do ich najważniejszych cech należą: wysoka aktywność i duża selektywność, decydująca o szybkości działania związku i liczbie koniecznych aplikacji. Istotny jest także czas rozkładu substancji w środowisku i jego ewentualny toksyczny wpływ na człowieka i zwierzęta. W tabeli 1 przedstawiono podział pestycydów ze względu na grupy organizmów, na które działają.

Najliczniejsze i najczęściej stosowane są organiczne biocydy, czyli chemiczne środki ochrony roślin, żywności i człowieka, uniemożliwiające lub ograniczające rozwój mikroorganizmów odpowiedzialnych za biologiczny rozkład roślin, środków spożywczych, przemysłowych i tworzyw. Należą do nich m.in. aminy, amidy, fenole i ich pochodne, sulfidy, karbaminiany, izotiazole, tioftalimidy, pochodne triazynowe i inne [30].

PRZYKŁADOWE MECHANIZMY DZIAŁANIA PESTYCYDÓW

Omówienie mechanizmów nabywania odporności na środki ochrony roślin wymaga uprzedniego zapoznania się ze sposobem działania najczęściej stosowanych substancji. Nabywanie odporności jest zwykle związane z modyfikacją struktur lub cząsteczek docelowych dla biocydów lub też ze zmianami w transporcie substancji czynnej wewnątrz organizmu patogena. W celu pełniejszego obrazowania efektów zmian w genomie patogenów roślinnych, w niniejszej pracy przedstawiono przykłady działania związków stosowanych w ochronie roślin. Do najczęściej spotykanych patogenów i szkodników roślinnych należą bakterie, grzyby, owady oraz chwasty. Z tego względu liczbę przykładów ograniczono do związków skierowanych przeciwko tym organizmom.

TABELA 1. Podział biocydów w zależności od typu związku, jego właściwości lub organizmu docelowego (wg [30], zmodyfikowano)

Podział biocydów w zależności od organizmów docelowych	
Bakteriocydy – zwalczające bakterie	
Zoocydy – zwalczające organizmy zwierzęce: Insektocydy – środki owadobójcze Rodentocydy – środki gryzoniobójcze Moluskocydy – środki mięczakobójcze Nematocydy – środki nicieniobójcze Larwicydy – środki larwobójcze Aficydy – środki mszycobójcze Akarycydy – środki roztoczobójcze Owicydy – środki niszczące jaja i roztocza	
Fungicydy – zwalczające grzyby	
Herbicydy – zwalczające chwasty	
Podział biocydów w zależności od typu związku chemicznego – przykłady	
Nieorganiczne	związki rtęci, cynku, miedzi, arsenu, fluoru, siarka, boraks, chloran sodu
Metaloorganiczne	alkilowe pochodne cyny (estry i etery tributylcyny), miedzi, cynku, manganu i rtęci
Organiczne	aminy, amidy, chlorowane i niechlorowane pochodne fenolowe, bifenole, sulfidy, karbaminiany (ditiokarbaminian, aminokarb, propoxur, karbaryl), izotiazole, tioftalimidy, pochodne triazynowe (symazylna, atrazylna, propazylna)
Podział biocydów w zależności od właściwości związku chemicznego – przykłady	
Utleniające	brom, bromochlorohydantoina, chlor, dwutlenek chloru, jod, estry kwasu izocyjanurowego
Nieutleniające	bromonitropropandiol, bromonitrostyren, karbaminian, aldehyd glutarowy, izotiazol

Bakteriocydy

Stosowane w rolnictwie środki bakteriobójcze stanowią dużą grupę, w skład której wchodzi głównie antybiotyki, sulfonamidy, pochodne 8-hydroksychinoliny i in. Antybiotyki, stanowią bardzo liczną grupę związków i nie będą szczegółowo omawiane w niniejszej pracy.

Podstawowe mechanizmy działania bakteriocydów polegają na rozbijaniu struktury lub zmianie przepuszczalności ściany komórkowej, hamowaniu procesów energetycznych oraz biosyntezy. Przykłady związków działających bakteriobójczo przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2. Przykłady bakteriocydów (wg [18], zmodyfikowano)

Elementy/mechanizmy komórki docelowe dla bakteriocydu	Przykłady związków
Ściana komórkowa	bacytracyna, cefalosporyny, penicyliny
Błony komórkowe	jonofory, polimyksyny
Synteza białek	aminoglikozydy, chloramfenikol, tetracyklina
Synteza RNA	rifamycyna
Synteza DNA	chinolony
Synteza kwasu foliowego	sulfonamidy

Jednym ze związków stosowanych jako składnik preparatów bakteriobójczych jest inhibitor syntetazy glutaminy, fosfinotricyna (PPT). Związek ten jest analogiem kwasu glutaminowego toksycznym dla bakterii i roślin. Formą stosowaną w ochronie roślin jest tripeptyd L-alanino-L-alanino-fosfinotricyna, z którego komórkowe peptydazy odcinają dwa aminokwasy, a powstała fosfinotricyna działa jako kompetycyjny inhibitor syntetazy glutaminy. Blokada enzymu przyczynia się do raptownego zwiększenia wewnątrzkomórkowego poziomu amoniaku, co skutkuje rozbięciem struktur błonowych, a u roślin dodatkowo zahamowaniem fotosyntezy. Konsekwencją jest śmierć organizmu [21].

Sulfonamidy są kompetycyjnymi inhibitorami syntazy dihydropterianu, analogami kwasu p-aminobenzoowego. Działanie antybiotyku zaburza wewnątrzkomórkowy metabolizm bakterii blokując syntezę kwasu dihydrofoliowego, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania biosyntezy puryn i pirymidyn oraz nukleotydowych kofaktorów, takich jak NAD [17,29].

Czwartorzędowe związki amoniaku (np. chlorek benzalkoniowy) wpływają na przepuszczalność błon bakteryjnych i powodują koagulację cytoplazmy. Stosowane są głównie przeciw bakteriom Gram+, ale też niektórym Gram-, wirusom, grzybom i pierwotniakom [40].

Insektycydy

Spośród preparatów insektycydowych najliczniej reprezentowaną grupą są neurotoksyny, działające na receptory synaptyczne, acetylocholinesterazę lub aksony komórek nerwowych owada. Działanie insektycydów należących do grupy tzw. insektycydów o niekonwencjonalnym mechanizmie działania polega na zaburzeniu rozwoju biologicznego owadów, ich żerowania i komunikacji osobniczej. Tego typu preparaty blokują m.in. syntezę chityny czy receptory błon komórek nabłonka jelita środkowego.

Hamowanie aktywności acetylocholinesterazy (AChE), enzymu hydrolizującego acetylocholiny w synapsach nerwowych, zachodzi na zasadzie inhibicji kompetycyjnej. Związki fosforoorganiczne będące składnikami preparatów insektycydowych są hydrolizowane przez AChE, czego skutkiem jest fosforylacja seryny w miejscu aktywnym enzymu i kilkudniowa blokada jego aktywności, prowadząca do śmierci owada [35].

Jako tzw. bioinsektycydy stosuje się pochodne toksyn bakteryjnych – grupy bioinsektycydowych białek krystalicznych (Cry) produkowanych przez *Bacillus thuringiensis**. Do tej pory zsekwencjonowano ponad 100 genów kodujących białka Cry. Są to sekwencje o wysokim stopniu zmienności, często kodowane przez plazmidy jako fragmenty większych struktur, zawierających ruchome elementy genetyczne. Toksyczne działanie tych białek zostało stwierdzone dla wielu gatunków owadów, jak również dla niektórych nicieni i pierwotniaków. Kryształy białkowe po spożyciu ulegają solubilizacji, a uwolnione protoksyny podlegają obróbce proteolitycznej w jelicie owadów. Powstałe toksyny wiążą się z receptorami powierzchniowymi komórek nabłonka jelita środkowego, wnikają w błony i formują nieselektywne kanały jonowe lub pory. W wyniku niekontrolowanego napływu wody i jonów komórki pęcznieją i następuje ich liza. Geny kodujące krystaliczne białko *B. thuringiensis* wykorzystuje się również do transformacji roślin w celu uzyskania odmian odpornych na owady. Toksyczność białek Cry jest wysoce specyficzna i ogranicza się do niektórych grup owadów i bezkręgowców. Z tego względu *B. thuringiensis* jest obecnie najszerszej stosowanym pestycydem pochodzenia biologicznego [33].

Potencjalnym bioinsektycydem jest również neurotoksyna z jadu pająka – atracotoksyna. Blokują one bramkowane napięciem kanały wapniowe w błonie komórkowej neuronów [42].

Działanie owadobójcze będące wynikiem specyficznego blokowania kanałów jonowych wykazują też syntetyczne insektycydy organiczne (pyretroidy, cyklodieny). Blokują one kanały sodowe w osłonce neuronów, doprowadzając do hiperpolaryzacji błony, blokady przewodzenia impulsów i paraliżu układu nerwowego [8,34,46].

Fungicydy

Większość fungicydów wpływa hamująco na procesy związane z biosyntezą oraz podziałem jądra komórkowego, funkcjonowaniem błony cytoplazmatycznej i mitochondriów, a także na przemiany energetyczne. Natomiast tzw. fungicydy trzeciej generacji wzbudzają reakcje odpornościowe rośliny, działając jak abiotyczne induktory (elicitory).

Za najbardziej aktywne grzybobójczo uważa się pestycydy blokujące podział jądra komórkowego i biosyntezę ergosterolu. Podziały mitotyczne są hamowane przez związki benzimidazolowe (karbendazym, tiabendazol, benomyl, tiofanat metylu). Działanie tych związków polega na blokowaniu kurczliwości mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego, po związaniu się herbicydu z podjednostką β białek tubulinowych. Do fungicydów blokujących syntezę ergosterolu (IBE, inhibitory biosyntezy ergosterolu) należą związki triazolowe, imidazolowe i strobilurynowe [2].

*Owadzi patogen *B. thuringiensis* należy do bakterii Gram (+) produkujących przetrwalniki. Podczas stacjonarnej fazy wzrostu produkuje krystaliczne białko (Cry) o właściwościach owadobójczych. Toksyczne białka kodowane są przez licznie występujące w genomie bakterii plazmidy. Zaobserwowano interakcje (synergistyczne, jak i antagonistyczne) pomiędzy toksynami pochodzącymi z różnych szczepów *B. thuringiensis*. *B. thuringiensis* oficjalnie jest gatunkiem odrębnym od *B. cereus*, lecz metody biochemiczne i morfologiczne, a nawet niektóre z metod molekularnych nie pozwalają na jednoznaczne rozróżnienie obu gatunków. Część badaczy postuluje więc traktowanie ich jako członków tego samego gatunku (*B. cereus*).

Związki metali, siarki oraz większość fungicydów aromatycznych to niespecyficzne inhibitory enzymów uczestniczących w przemianach energetycznych. Zaburzenia przemian energetycznych mogą też wynikać z uszkodzeń błony lub zaburzenia transportu elektronów przez błonę mitochondrialną. Zahamowanie biosyntezy białek polega najczęściej na zakłóceniu reakcji włączenia aminokwasów do kompleksu polipeptydowego. Taki sposób działania charakteryzuje organiczne związki fosforu. Uszkodzenie białek błony komórkowej zakłóca jej przepuszczalność [2], a stymulacja wzrostu stężenia akumulowanego glicerolu wywołuje w komórkach stres hiperosmotyczny [45]. Sposoby działania fungicydów oraz przykłady substancji czynnych przedstawiono w tabeli 3.

TABELA 3. Przykładowe fungicydy oraz sposób ich działania

Sposób działania fungicydu	Przykłady związków	Literatura
Blokada podziału mitotycznego *	związki benzimidazolowe (karbendazym, tiabendazol, benomyl, tiofanat metylu)	[2]
Blokada biosyntezy ergosterolu	związki triazolowe, imidazolowe, strobilurynowe (IBE)	[2]
Zahamowanie biosyntezy białek	organiczne związki fosforu (pirazofoz), niektóre fungicydy dichlorofenylamidowe procymidon, iprodion, winklozolina)	[2]
Zahamowanie biosyntezy RNA	związki fenylamidowe (metalaksyl)	[2]
Zaburzenia przemian energetycznych: – uszkodzenia błon mitochondrialnych – wakuolizacja wewnętrznej błony mitochondrialnej	związki difenylamidowe, dinokap terrazol	[22] [22]
Zaburzenia przemian energetycznych – zahamowanie transportu elektronów przez błonę mitochondrialną	związki strobilurynowe	[22]
Zaburzenia przemian energetycznych – niespecyficzna inhibicja enzymów	związki metali (miedzi, cyny, rtęci), związki siarki tiokarbaminiany, fungicydy aromatyczne	[22]
Zakłócenie przepuszczalności błony komórkowej	dodyna (monoocetan guanidyny, kationowy surfaktant), tridemorf	[2]
Stres hiperosmotyczny	fungicydy fenylpirolowe	[45]
Wzbudzenie reakcji odpornościowej rośliny	fosetyl glinu	[43]

*) Działanie tych związków polega na blokowaniu kurczliwości mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego, po związaniu się fungicydu z podjednostką β białek tubulinowych

Herbicydy

Działanie herbicydów polega głównie na blokowaniu syntezy aminokwasów, karotenoidów lub lipidów, a także na zaburzeniu cyklu wzrostowego rośliny. Wiele związków działa też poprzez hamowanie transportu elektronów w chloroplastach.

Przykładem związków uszkadzających elementy fotosystemu mogą być DCMU (dichlorofenylodimetylomocznik) i Parakwat (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-dipirydyli). DCMU blokuje przepływ elektronów pomiędzy fotoukładami PS II i PS I przy przenośniku elektronów – cząsteczce ubichinonu Q_A , która jest połączona z drugą cząsteczką ubichinonu Q_B . Struktura Q_B decyduje o powstaniu połączenia z Q_A . W przypadku zablokowania transferu elektronów między cząsteczkami ubichinonu (na skutek działania herbicydu lub np. mutacji w genie kodującym Q_A) możliwe jest powstanie mutacji, zmieniającej strukturę Q_B , co decyduje o powstaniu alternatywnego połączenia między białkami, a zatem o odporności na DCMU.

Parakwat przechwytuje elektrony przekazywane pomiędzy PS I i $NADP^+$, działając jako egzogenny akceptor elektronów i przekazując je następnie na tlen. Skutkiem nieprawidłowego transportu elektronów jest powstawanie w chloroplastach rodników ponadtlenkowych O_2^- i uszkodzenie składników chloroplastu, w szczególności lipidów i białek [28].

2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) należy do pochodnych fenoksykwasów i działa jak regulator wzrostu roślin podobny do auksyn. W większych stężeniach niszczy rośliny dwuliścienne, zmuszając je do nadmiernie szybkiego wzrostu, w wyniku czego rośliny ginie. Rośliny jednoliścienne mają szybki sposób detoksykacji 2,4-D, dlatego herbicyd ten stosuje się do zwalczania dwuliściennych chwastów w uprawach jedno-liściennych [28].

Glyfosat to herbicyd o szerokim spektrum działania. Blokuje on aktywność syntazy kwasu 5-enolopirogrono-3-fosfozikimowego (EPSPS), która uczestniczy w biosyntezie aminokwasów aromatycznych. Herbicyd jest nieszkodliwy dla zwierząt, niedokonujących syntezy tych aminokwasów [28].

Do inhibitorów syntazy acetylomleczanowej (ang. *acetolactate synthase*, ALS) należą herbicydy sulfonynolmocznikowe oraz imidazole. Inhibitory ALS wpływają na zahamowanie szlaku metabolicznego leucyny, izoleucyny i waliny poprzez zablokowanie jednego z dwóch (lub obu) miejsc w cząsteczce enzymu. Herbicydy mogą hamować wzrost komórek poprzez inhibicję syntazy celulozowej, prawdopodobnie blokując miejsce wiązania pewnych regulatorów lub fragment białka odpowiedzialny za formowanie poru, którym łańcuchy celulozowe przechodzą przez błonę komórkową. Przykładem tego typu herbicydów są tiazolidinony i izoksaben [32].

Do najczęściej stosowanych należą herbicydy triazynowe, mocznikowe, karbaminianowe, tiokarbaminianowe, amidowe i fenoksyalkanokarboksyłowe. Wprowadza się też herbicydy nowego typu – fotodynamiczne. Są to herbicydy o strukturze dwupierscieniowej typu difenyl-eter (np. acifluorfen, oksyfluorfen), działające na zasadzie inhibicji kompetycyjnej w miejscu przyłączenia naturalnego substratu dla oksydazy protoporfirynogenu IX. Jest to ostatni enzym szlaku biosyntezy tetrapirołu, a jego zablokowanie prowadzi do akumulacji protoporfirynogenu IX. Wynikiem jest absorpcja energii świetlnej przez protoporfirynogen IX, fotooksydacja i uwolnienie toksycznych dla komórki reaktywnych form tlenu [19].

Herbicydy działają selektywnie w zależności od rozmieszczenia systemu korzeniowego chwastów i roślin uprawnych w glebie. Substancje te działają na systemy enzymatyczne, funkcjonujące w określonych, wyspecjalizowanych tkankach, dlatego docelowe miejsce działania herbicydów w roślinie odgrywa również dużą rolę. Odporność na herbicyd może być wynikiem słabego przemieszczania się tego związku do tkanki docelowej, na przykład wierzchołków wzrostu.

Selektywność działania herbicydu w stosunku do określonych gatunków roślin wynika głównie ze zdolności pewnych roślin (np. uprawnych) do jego detoksykacji. Odporność na 2,4-D polega na jego szybkim metabolizowaniu. Może się to odbywać drogą hydroksylacji pierścienia aromatycznego, przyłączenia glukozy lub kwasu asparagowego przy grupie karboksylowej, jak też poprzez reakcję utlenienia łańcucha bocznego, którego usunięcie powoduje zanik aktywności hormonalnej. Zbyt wolne przeprowadzanie tej ostatniej reakcji jest przyczyną wrażliwości chwastów dwuliś-ciennych na ten herbicyd [15]. Każdy herbicyd w stężeniu większym niż stężenie niszczące określoną grupę chwastów może uszkodzić lub zniszczyć także roślinę uprawną.

DZIAŁANIE PESTYCYDÓW NA ORGANIZMY INNE NIŻ DOCELOWE

Wpływ biocydów na rośliny uprawne może mieć dwojaki charakter. Zazwyczaj działania pozytywne przeważają nad szkodliwymi skutkami ubocznymi ich stosowania. Część pestycydów, jak fungicyd kaptan, może korzystnie wpływać na wzrost liści i pędów, intensywność fotosyntezy oraz zabarwienie owoców poprzez stymulację gromadzenia antocyjanów w skórce owoców, np. jabłek [2]. Stosowanie fungicydów chroni rośliny przed akumulacją mykotoksyn w tkankach, a herbicydów – przed nadmierną konkurencją o wodę i energię świetlną [28]. W wielu przypadkach trudno jest jednak wyeliminować negatywny wpływ pestycydów na rośliny uprawne. Stosowane substancje są często toksyczne dla roślin, wywołując powstawanie nekroz na liściach, kwiatach i owocach. Związki miedzi i siarki mogą przyczyniać się do silnego uszkodzenia liści i owoców, a nieorganiczne związki siarki powodują ponadto zahamowanie fotosyntezy. Substancje te zwiększają również transpirację kutykularną kosztem zatrzymania transpiracji szparkowej. Z kolei zaprawy do nasion często obniżają zdolność i energię ich kiełkowania.

Większość chemicznych pestycydów ma bardzo szerokie spektrum działania i niszczy, oprócz szkodników, także organizmy pożyteczne, wywołując niekorzystne zmiany w składzie i strukturze fauny glebowej [30]. Powszechne stosowanie środków ochrony roślin, a także nieorganicznych nawozów wpływa redukująco na produktywność i jakość gleby, która w pewnym stopniu zależy od procesów fizjologicznych żyjących w glebie mikroorganizmów. Pestycydy mogą wpływać na gęstość występowania glebowych bakterii i grzybów, ich aktywność i wzrost, przyczyniając się do niekorzystnych zmian w liczebności i strukturze populacji tych mikroorganizmów. Zmiany te prowadzą do spadku różnorodności i zaniku funkcji mikroorganizmów glebowych i zachwiania równowagi dynamicznej środowiska glebowego [13].

Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin nie pozostaje również bez wpływu na człowieka. Pestycydy wywierają duży wpływ na system immunologiczny osób pracujących przy ich produkcji, stosujących je rolników, a także mieszkańców terenów rolniczych oraz konsumentów wyprodukowanej przy ich użyciu żywności. Wpływ ten jest najczęściej immunosupresywny, czasem jednak immunostymulujący, w zależności od rodzaju stosowanego środka oraz dawki. Immunosupresja zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów. Immunostymulacja przyczynia się do pojawiania się chorób autoimmunologicznych i alergii [41].

Dyrektywy Unii Europejskiej ściśle określają rodzaj i ilość związków stosowanych jako biocydy, wprowadzanych na rynki krajów UE. Wyklucza się użycie związków działających niekorzystnie na organizm, np. wydzielających formaldehyd, tworzących rakotwórcze nitrozoaminy. Także produkty przemian chemicznych i mikrobiologicznych używanych pestycydów nie mogą wykazywać działania toksycznego, rakotwórczego, uczulającego itp. [30]. Pestycydy organiczne mają określony czas trwałości, determinujący czas karencji (najkrótszego okresu, jaki musi upłynąć od ostatniego kontaktu roślin z preparatem do terminu ich zbioru i spożycia) [28].

MECHANIZMY NABYWANIA ODPORNOŚCI NA ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN

Rozwój odporności na pestycydy jest procesem ewolucyjnym, w którym dany pestycyd działa jako presja selekcyjna na populację zróżnicowaną genetycznie pod względem odporności na niego. Tempo tego procesu zależy od zróżnicowania genetycznego tej populacji oraz od intensywności selekcji [23]. Określenie charakteru odporności i zidentyfikowanie odpowiedzialnych za ten mechanizm mutacji powinno w przyszłości pozwolić, w powiązaniu z badaniami z dziedziny genetyki populacyjnej i ekologii, na stworzenie zintegrowanych technik ochrony roślin (ang. *Integrated Pest Management*, IPM) [39].

Wrażliwość organizmu na dany związek zależy od trzech cech: istnienia w komórce elementu docelowego dla pestycydu, posiadania mechanizmu transportu substancji do wnętrza komórki oraz braku enzymów inaktywujących lub modyfikujących te związki. Zmiana którejkolwiek z tych cech prowadzi do nabycia odporności przez organizm [18]. W każdej populacji, obok dominujących form wrażliwych, mogą w wyniku mutacji, krzyżowania i heterokariozy (u grzybów) pojawić się osobniki odporne. Formy te, początkowo nieliczne, wskutek selekcyjnego działania pestycydu, stopniowo zaczynają dominować w populacji. Prawdopodobieństwo nabycia odporności w dużym stopniu, obok zmienności gatunkowej organizmu, zależy od mechanizmu działania związku. Pestycydy działające na kilka układów enzymatycznych jednocześnie (np. zakłócające funkcje energetyczne) stwarzają mniejsze niebezpieczeństwo uodpornienia się osobnika niż związki selektywne, działające na ściśle określone funkcje. Odporność na pestycydy wchodzące w specyficzne reakcje z elementami komórki (np. inhibitory syntezy ergosterolu – związki benzimidazolowe) wykształca się często w bardzo krótkim czasie na skutek pojedynczych mutacji punktowych. Przykłady mutacji punktowych nadających odporność przedstawiono w tabeli 4. 4n.org.pl

TABELA 4. Przykłady mutacji punktowych nadających odporność na biocydy

Organizm	Biocyd	Gen i jego rola	Zmiana aminokwasu	Uwagi	Lit.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	tetracyklina	<i>rpsJ1</i> – koduje rybosomalne białko S10	Val 57 → Met/Leu/Gln	zmiana struktury RNA w pobliżu miejsca przyłączenia antybiotyku	[16]
<i>Escherichia coli</i>	microcin B17*	<i>gyrB</i> – koduje podjednostkę β bakteryjnej gyrazy	Trp 751 → Arg	podwójna tranzycja AT w GC	[6]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	fluorochinolony np. ciprofloksacyna	<i>parC</i> – koduje bakteryjną topoisomerazę IV	Asp 86 → Asn Ser 87 → Ile Ser 88 → Pro Glu 91 → Gly		[7]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ciprofloksacyna ofloksacyna norfloksacyna	<i>gyrA</i> – koduje podjednostkę α bakteryjnej gyrazy <i>parC</i> – koduje bakteryjną topoisomerazę IV	Thr 83 → Ile		[25]
			Asp 87 → Gly/Asn Ser 80 → Leu Glu 84 → Lys		[25]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Synechococcus</i> sp.	atrazynan DCMU metribuzin	<i>psbA1</i> – gen kodujący białko Q _B	np. Ser 264 → Gly/Glu/Ala Pro/Thr/Cys	u roślin wyższych mutacja Ser264Gly powoduje zmniejszoną produktywność efektywność fotosyntezy	[31]
			Phe 255 → Leu/Tyr Leu 271 → Val/Met/Ala	kurkulacja mutacji wpływa na stopień odporności	
<i>Synechocystis</i>	metribuzin atrazyna ioxynil	<i>psbA1</i> – gen kodujący białko Q _B	Ala 251 → Val Ile 248 → Thr Asn 266 → Thr Ser 264 → Ala	zwiększona wrażliwość na stres świetlny kurkulacja mutacji wpływa na stopień odporności	[27]
<i>Glycine max</i>	atrazyna	<i>psbA</i> – gen kodujący białko Q _B	Ser 268 → Pro	zwiększona wrażliwość na stres świetlny	[1]

TABELA 4. cd.

Organizm	Biocyd	Gen i jego rola	Zmiana aminokwasu	Uwagi	Lit.
<i>Solanum tuberosum</i>	atrazyna	<i>psbA</i> – gen kodujący białko Q _B	Ser 264 → Thr	brak spadku efektywności fotosyntezy, prawdopodobnie dzięki zachowaniu grupy -OH łańcucha bocznego aminokwasu i utrzymaniu wiązań chemicznych w cząsteczce	[37]
<i>Lucilia cuprina</i> , <i>Musca domestica</i>	insektycydy fosforoorganiczne, np. diaznon	<i>LcaE7</i> – gen kodujący karboksylesterazę	Gly 137 → Asp Ala 267 → Val Met 283 → Leu Thr 335 → His Ile 358 → Phe	zmiana karboksylesterazy w hydrolazę insektycydu, – zmiana konformacji miejsca aktywnego pozwalająca na ustawienie cząsteczki wody w pozycji dogodnej do przeprowadzenia reakcji hydrolizy i regeneracji ufosforylowanego enzymu; często dodatkowo występuje podwyższona ekspresja GST, cyt. p450, esteraz	[26]
<i>Drosophila melanogaster</i>	insektycydy fosforoorganiczne, np. malation	<i>ace</i> – gen acetylocholinesterazy, AChE	Phe 268 → Tyr Gly 256 → Val** Ile 161 → Val Phe 330 → Tyr Gly 368 → Ala	następuje zmiana właściwości katalitycznych enzymu, poziom odporności koreluje z liczbą kopii genu <i>ace</i> mutacje dotyczą miejsca aktywnego lub jego sąsiedztwa; wpływa to negatywnie na stabilność enzymu; kumulacja mutacji wpływa na szerszy zakres odporności, jednocześnie zmniejszając stabilność enzymu; tylko jedna z mutacji kompensuje to podwyższoną aktywnością AChE	[10] [35]

*) działanie polega na inhibicji podj. β bakteryjnej gryzaki. Bakteriocyd prawdopodobnie blokuje miejsce, przez które przeplatana jest nieprzecięta nić DNA

***) mutacja powoduje wzrost aktywności enzymu

Możliwe jest również wystąpienie zjawiska odporności krzyżowej, polegającego na wykształceniu odporności na kilka substancji, należących do grupy związków o podobnym mechanizmie działania. Zablokowanie mechanizmu działania substancji czynnej pozwala na uodpornienie się na kilka związków w wyniku kontaktu tylko z jednym z nich.

Przykładem może być powiązanie odporności bakterii na streptomycynę z odpornością na inne antybiotyki z grupy aminoglikozydów (odporność krzyżowa między metycyliną, streptomycyną i tetracykliną) [9]. U grzybów często występuje zjawisko nabywania odporności krzyżowej, którego przyczyną jest nadużywanie fungicydów benzimidazolowych, dikarboksyimidowych i fenyloamidowych [2]. Zależności między nabywaniem odporności na najczęściej stosowane insektycydy przedstawiono na rycinie 1.

Działanie presji selekcyjnej w kierunku zwiększania puli genów odporności w populacji przejawia się już w najwcześniejszych stadiach rozwoju organizmów. Przyczyną bardzo szybkiego uodpornienia się chwastów na herbicydy – inhibitory ALS jest wystąpienie mutacji punktowych w genie enzymu syntazy acetylmleczanowej. Uważa się, że na słupku kiełkują jedynie zmutowane ziarna pyłku, co zwiększa prawdopodobieństwo utrzymania się i rozprzestrzenienia mutacji w populacji [12].

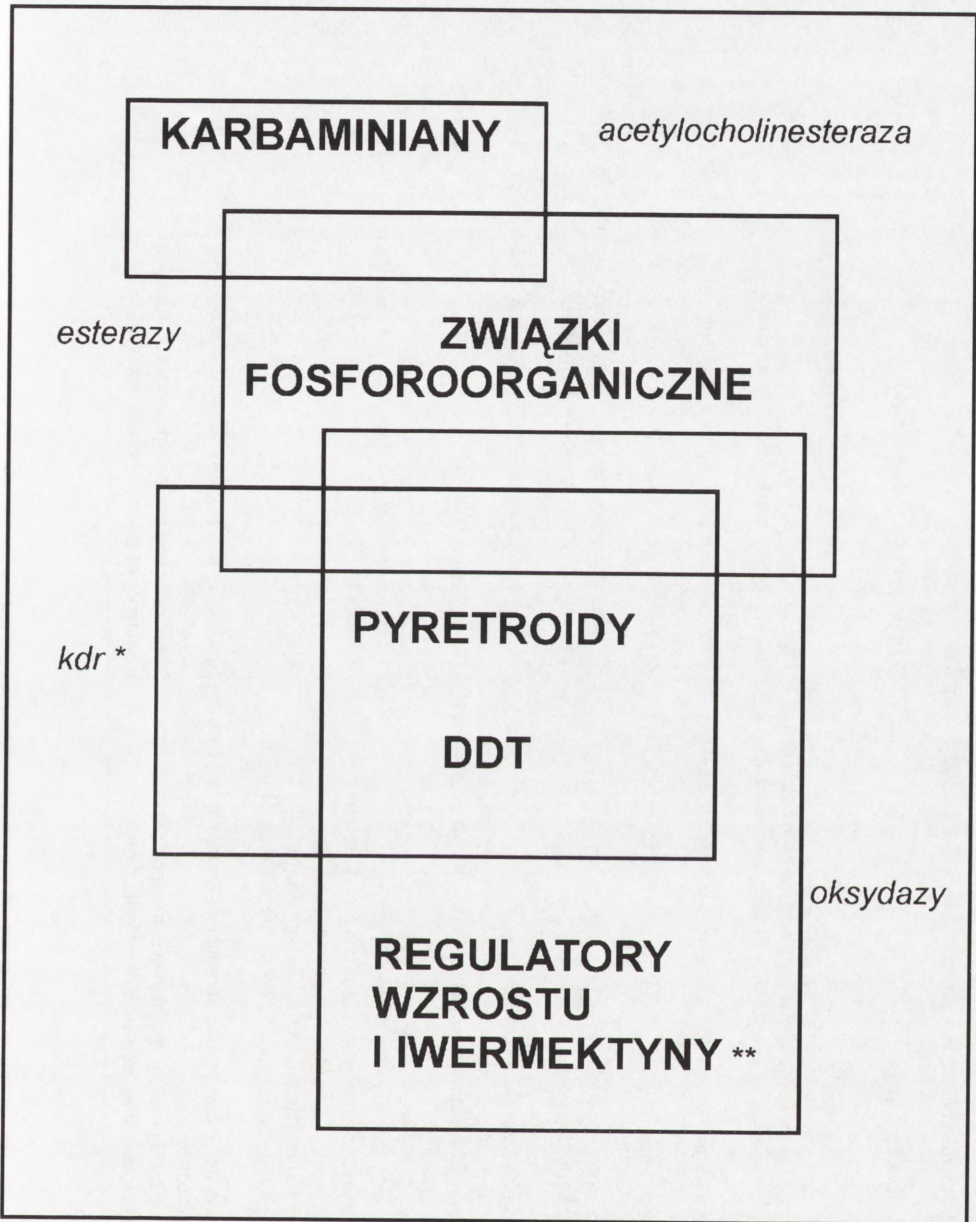
Ewolucyjny proces nabywania odporności na środki ochrony roślin może służyć jako dobry model adaptacji organizmów. Adaptacja ta może odbywać się różnymi drogami, które zazwyczaj determinują szybkość wykształcenia odporności oraz jej mechanizm. Przykłady niektórych mechanizmów nabywania odporności zaprezentowano w tabeli 5.

Mutacje punktowe powodujące zmianę właściwości i/lub struktury białka docelowego

Mutacje punktowe mogą zmieniać konformację miejsca wiązania pestycydu do białka, przez co wiązanie z pestycydem jest nietrwałe lub wręcz niemożliwe. Przykładem może być mutacja w genie kanału sodowego owadów, powodująca niewrażliwość tego kanału na pyretroid [46]. Za zmianę w interakcji enzymu z inhibitorem (tzw. herbicydami typu fop i dim – haloxyfop, sethoxydim) odpowiada też mutacja punktowa w genie plastydowej karboksylazy acetylo-CoA, dzięki czemu herbicydy te nie inaktywują docelowego enzymu [44]. Ocenia się, że minimum 5 różnych mutacji punktowych w miejscu wiązania insektycydu przez AChE odpowiada, pojedynczo lub wspólnie, za zróżnicowany stopień odporności na związki fosforoorganiczne i insektycydy karbamylowe [3,35].

Dwie mutacje punktowe powodują powstanie izoformy syntazy celulozowej niewrażliwej na herbicydy izoksabenowe i tiazolimidowe [32]. Z kolei, wywołane mutacjami punktowymi zmniejszone powinowactwo enzymu sterolo-14 α -demetylasy do fungicydów imidazolowych i triazolowych odpowiada za znaczne zmniejszenie skutków działania prochlorazu i innych fungicydów należących do tych grup [8].

Zmutowane odporne białko może być jednak mniej stabilne, przy czym stabilność jest skorelowana z liczbą mutacji punktowych w pierwotnym genie. Zależność taką udokumentowano w przypadku zmutowanego genu dla AChE u *Drosophila melano-gaster* [35].



RYCINA 1. Zależności w występowaniu odporności krzyżowej na najczęściej używane grupy insektycydów. W ramach podano grupy związków będących składnikami preparatów insektycydowych. Kursywą wypisane zostały nazwy enzymów detoksykujących odpowiadających za odporność na dane grupy insektycydów (wg [3], zmieniono): *kdr** (ang. *knockdown resistance*) – odporność na szok, odporność układu nerwowego owadów na paraliż wywołany insektycydami blokującymi kanały jonowe; ** – ivermektyny należą do syntetyzowanych przez bakterie z rodzaju *Streptomyces* związków z grupy laktonów makrocyclicznych stosowanych jako nematocydy i insektycydy, blokują bramkowane kwasem glutaminowym kanały sodowe bezkręgowców, co prowadzi do paraliżu mięśni

TABELA 5. Przykłady molekularnych mechanizmów odporności patogenów i szkodników roślin na pestycydy

Mechanizm nabycia odporności	Przykład - mechanizm odporności	Typ pestycydu, rodzaj związku	Literatura
Mutacja punktowa	<ul style="list-style-type: none"> - mutacja w genie kanału sodowego w miejscu wiązania pyretroidu - zmiana aminokwasu w receptorze GABA (kwasu γ-aminomasłowego) - zmiana I aminokwasu, zmiana specyficzności esterazy w hydrołazę insektycydu - mutacja w silnie konserwatywnym regionie genu syntazy celulozowej 	<p>Insektycydy (pyretroid)</p> <p>Insektycydy organofosforowe (malation) i karbamylowe (propoxur)</p> <p>Insektycydy organofosforowe (malation) i karbamylowe (propoxur)</p> <p>Herbicydy (tiazolidinony, izoksaben)</p>	[46] [3] [3] [32]
Ampifikacja kopii genu	<ul style="list-style-type: none"> - nadekspresja monoooksygenazy cytochromu p450 - wzrost liczby kopii esterazy - nadekspresja transferaz glutationowych 	<p>Insektycydy (pyretroid), Herbicydy (fenylomocznik).</p> <p>Insektycydy organofosforowe (malation) i karbamylowe (propoxur)</p> <p>Herbicydy chlóracetamidów (acetochlor, metolachlor)</p>	[46][36] [3] [14]
Zmiana stabilności mRNA	<ul style="list-style-type: none"> - zwiększenie stabilności transkryptu genu monoooksygenazy cytochromu p450 wskutek mutacji 	Insektycydy (pyretroid)	[46]
Nadekspresja lub zmiana powinowactwa do białka docelowego	<ul style="list-style-type: none"> - zmiana powinowactwa sterolo-14α-demetylazy - wiele zmian w miejscach przyłączania białka Cry do receptorów komórkowych w jelicie owadów - mechanizm nieznan - zmiany w miejscu przyłączenia herbicydu typu difenyleter do oksydazy protoporfirynogenu IX. Połączenie inhibitora nie trwa 	<p>Fungicydy imidazolowe (prochloraz) i triazolowe</p> <p>Bionsektycydy (Cry)</p> <p>Herbicydy (acifluorfen, oxyfluorfen)</p>	[8] [33] [19]
Minimalizacja skutków działania pestycydu	<ul style="list-style-type: none"> - hiperaktywacja MAP kinaz szlaku transdukcji sygnałów w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny - usuwanie pestycydu przez pompy błonowe, transport aktywny - zmiana składu kwasów tłuszczowych błony komórkowej 	<p>Fungicydy fenylpirolowe (fludioxonil), herbicydy dikarboksamidowe</p> <p>Fungicydy imidazolowe (prochloraz) i triazolowe</p> <p>Bakteriocyd (chlorek benzalkoniowy)</p>	[45] [8] [40]

Amplifikacja kopii genu

Strategia ta ma na celu osiągnięcie wyższego poziomu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za detoksykację ksenobiotyków. Najczęstszym przykładem jest zwiększenie kopii genu esterazy do ponad 250 u owadów, m.in. komarów, zwiększające odporność na związki fosforoorganiczne i karbaminiany, dzięki szybszej detoksykacji tych insektycydów [24].

Mutacje punktowe powodujące zmianę właściwości i/lub struktury białka innego niż docelowe

Istnieje również mechanizm odporności polegający na modyfikacji niektórych enzymów detoksykujących, niespecyficznym w stosunku do danego pestycydu i nie będących celem działania tych związków. W wyniku mutacji specyficzność takiego enzymu może zostać zmieniona w kierunku większego powinowactwa do konkretnego związku, co pozwala organizmom na skuteczną detoksykację lub inhibicję pestycydu. Przykładem mogą być esterazy, tworzące rodzinę złożoną z sześciu grup białek enzymatycznych. U *Diptera* występują one jako zgrupowanie genów na tym samym chromosomie. Poza mechanizmem odporności polegającym na amplifikacji kopii wielogenowych, mogą wystąpić również mutacje punktowe modyfikujące pojedyncze geny danej grupy. Na przykład zmiana niespecyficznego esterazy w specyficzną dla danego insektycydu hydrolazę może zajść w wyniku zmiany jednego aminokwasu w sekwencji białka [3,26].

Zwiększenie poziomu transkrypcji genów enzymów detoksykujących

Najczęściej występującym mechanizmem odporności owadów na insektycydy jest wzmocniona transkrypcja genów enzymów detoksykujących: esteraz, oksydaz, transferaz glutationowych [3,10]. Na przykład w odpowiedzi na presję selekcyjną wywieraną przez insektycydy chloracetanilidowe (atrazyna) u muchy domowej występuje zwiększenie poziomu transkrypcji transferaz glutationowych i esteraz biorących udział w detoksykacji tych związków [11]. Przykładem podobnego mechanizmu u roślin może być nadekspresja syntetazy γ -glutamylcysteiny (γ ECS), enzymu regulatorowego w procesie biosyntezy glutationu. Podwyższenie ekspresji γ ECS oraz transferaz glutationowych jest źródłem odporności na herbicydy chloracetanilidowe u topoli [14].

Nadekspresja białka docelowego dla pestycydu

W wyniku stosowania insektycydów karbamylowych i związków fosforoorganicznych może wykształcić się mechanizm odporności polegający na biosyntezie większej ilości kopii acetylocholinesterazy. Część cząsteczek enzymu pozostaje wówczas zdefosforylowana i aktywna, a poziom aktywnej AChE ściśle koreluje ze stopniem odporności [10]. Zazwyczaj jednak mechanizm ten wiąże się z występowaniem mutacji punktowych w genie AChE. Ze względu na to, że mutacje punktowe w genie enzymu powodują jego zmniejszoną aktywność i stabilność, nadekspresja kompensuje te niekorzystne zmiany poprzez zwiększenie ilości kopii białka [35].

Stabilizacja mRNA

Poziom enzymów może zostać zwiększony dzięki zapewnieniu większej stabilności transkryptu. Prawdopodobnie mutacja w jednym z genów monoooksygenazy cytochromu p450 wpływa na zwiększoną stabilność transkryptu tego genu i w ten sposób zwiększa wewnątrzkomórkowy poziom enzymu, co wpływa na odporność owadów na pyretroid [46].

Metabolizm i detoksykacja pestycydu

Częstym źródłem odporności jest zwiększenie poziomu i/lub aktywności związków wiążących ksenobiotyki (np. glutation, fitochelatyny) lub specyficznych enzymów biorących udział w inaktywacji pestycydu [8,10]. Przykładem mogą być bakterie odporne na analog kwasu glutaminowego – fosfinitricynę. Syntetyzują one enzym specyficznie go inaktywujący – acetylotransferazę fosfinitricyny [21].

Odporność może wynikać również z braku aktywnej formy enzymu, np. owady odporne na toksyczne białko Cry *B. thuringiensis* nie mają w jelicie proteaz zwykle trawiących protoksynę, w związku z czym niepoddany obróbce proteolitycznej bioinsektycyd pozostaje w formie nieaktywnej [33].

Minimalizacja skutków działania pestycydu

Tego typu strategie odpornościowe skutkują zwiększoną odpornością na toksyczne dotychczas związki poprzez: zmniejszenie stopnia wchłaniania pestycydu do komórki (zmiany w składzie ściany komórkowej, jej uszczelnienie, zmiany w budowie kanałów błonowych, którymi toksyczne substancje przedostają się przez błonę, zwiększenie ilości i aktywności pomp błonowych usuwających toksyny na zewnątrz komórki). Zwykle za osłabienie skutków działania pestycydów odpowiada zwiększenie naturalnej zdolności detoksykacji reaktywnych form tlenu powstałych w wyniku działania pestycydu na drodze szlaku antyoksydacyjnego. Często tego typu odporność, związana ze zwiększoną aktywnością lub ilością kopii enzymów szlaku antyoksydacyjnego, występuje u roślin odpornych na herbicydy uszkadzające fotosystem II. W odpowiedzi na herbicydy dikarboksymidowe i fungicydy fenylpirolowe, zwiększające poziom akumulacji glicerolu w komórkach, u odpornych roślin i grzybów następuje hiperaktywacja MAP kinaz szlaku transdukcji sygnałów związanego ze stresem osmotycznym i przywrócenie prawidłowego ciśnienia osmotycznego w komórce [45]. Możliwe jest też aktywne usuwanie ksenobiotyku poza komórkę w drodze transportu aktywnego, jak to ma miejsce u niektórych grzybów odpornych na prochloraz [8]. U bakterii częstym mechanizmem odporności jest zmiana składu kwasów tłuszczowych błony, jej struktury oraz zwiększona synteza kwasów teichojoyowych, co radykalnie zmniejsza przepuszczalność błony dla wielu antybiotyków [40].

Najczęstszą drogą przekazywania genów odporności u bakterii jest koniugacja. W genomie bakteryjnym odporność może być kodowana zarówno na chromosomie bakteryjnym, jak i przez plazmidy. Jeżeli plazmid występujący w komórce należy do koniugacyjnych, odporność może być przekazywana nawet między różnymi gatunkami bakterii, w dodatku proces ten nie zależy od obecności lub braku antybiotyków w

środowisku. Na przykład gen odporności na metycylinę u *Staphylococcus aureus* (Gram+) powstał z genu β -laktamazy *S. aureus* i fragmentu genu pochodzącego z innej bakterii, prawdopodobnie z *E. coli* (Gram-), kodującego białko wiążące penicylinę [18].

Mechanizm działania biocydów wpływa na czas wykształcenia się odporności na dany związek. Odporność na substancje niespecyficycznie blokujące różne układy enzymatyczne wykształca się wolniej niż w przypadku związków wysoce selektywnych w stosunku do substratu.

EWOLUCJA ODPORNOŚCI

Genetyczne podstawy odporności na pestycydy grają decydującą rolę dla ryzyka dalszego rozprzestrzenienia się odporności. Nagły spadek efektywności pestycydu jest bardziej prawdopodobny, gdy odporność jest skutkiem mutacji w jednym genie (np. gwałtowny rozwój oporności na benzimidazole w populacji grzybowych patogenów roślin). Jeżeli odporność pojawia się dopiero w efekcie synergistycznego działania dwóch zmienionych genów, dopiero mutacja w obu loci powoduje jej wystąpienie. Stopniowe zmiany w kierunku zmniejszonej wrażliwości na środki ochrony roślin mają miejsce, gdy odporność jest w danej populacji pod kontrolą poligenową. Selekcja jest w tym przypadku raczej kierunkowa niż różnicująca [8]. Wykorzystywane jest wówczas zjawisko naturalnego zróżnicowania wrażliwości na pestycydy u organizmów w populacji [19]. Mechanizmy odporności są bardzo złożone, gdyż na efekt działania pestycydu wpływ ma, poza genotypem patogena, również jego stan fizjologiczny i czynniki środowiskowe, w tym obecność i aktywność naturalnych wrogów.

Skutki nabycia odporności również bywają zróżnicowane. Substytucja w jednym locus z allelu wrażliwości w allel odporności może mieć wpływ na zmianę biochemicznych i fizjologicznych właściwości rozwojowych organizmu. Nabycie odporności na pestycydy może mieć negatywny wpływ na żywotność patogena w warunkach braku kontaktu z pestycydem, jak również na jego ogólną kondycję i płodność. Teoretycznie, wobec tego, że mutacje w allel odporności wpływają negatywnie na żywotność organizmów, allele te są z powodu selekcji naturalnej rzadkie w populacjach atakujących rośliny niechronione pestycydami. Nabyta cecha odporności mogłaby więc, w warunkach zaprzestania stosowania pestycydu, ulec rewersji pod wpływem selekcji naturalnej. Tak się jednak nie dzieje, badania empiryczne wskazują bowiem, że negatywne koszty nabycia odporności są w warunkach polowych w znacznym stopniu ograniczane [23]. Zamiast rewersji, częściej występuje ewolucja kompensacyjna. Istotnie, po nabyciu odporności przez pierwotnie wrażliwego patogena, jego żywotność i tempo metabolizmu mogą się zmniejszyć. Jednak w warunkach braku pestycydu w środowisku, w genomie patogena zachodzą mutacje kompensujące, zwiększające poziom metabolizmu i ogólną kondycję organizmu. W warunkach ponownego zastosowania pestycydu, patogeny pozostają odporne, a ich żywotność utrzymuje się na wysokim poziomie. Ewolucja i adaptacja są bowiem procesami postępowymi i nieodwracalnymi [20].

WPROWADZANIE ODPORNOŚCI JAKO STRATEGIA OCHRONY ROŚLIN

Przykłady omówione powyżej koncentrowały się na zgodnieniu odporności naturalnej. W celu podwyższenia produktywności upraw można również zastosować biotechnologiczne wprowadzanie odporności do genomów organizmów. Coraz popularniejsze staje się wykorzystanie biotechnologicznych metod konstruowania roślin uprawnych odpornych na substancje stosowane dla ich ochrony. Alternatywą dla bezpiecznego dla jednoliściennych stosowania 2,4-D coraz częściej staje się wprowadzanie do genomu roślin uprawnych genu odporności na stosowany herbicyd. Dzięki odporności roślin uprawnych można zwiększyć dawkę stosowanego środka chwastobójczego bez obaw o wysokość plonu. Niebezpieczeństwem przeniesienia się tych genów do genomu chwastów w wyniku zapylenia zapobiega się poprzez klonowanie genów odporności do genomu plastydowego lub przez podzielenie konstruktów i umieszczenie go w dwóch różnych genomach rośliny: plastydowym i jądrowym [5,38]. Zwykle wprowadzana jest odporność na herbicydy o szerokim spektrum działania. Przykładem może być wprowadzenie dodatkowej kopii genu enzymu EPSPS do genomu roślin uprawnych, co w znacznym stopniu zwiększyło ich odporność na glikofosat [28].

Odporność na szkodniki można uzyskać poprzez produkcję roślin produkujących toksyny (m.in. bawełna z wklonowanym i ulegającym ekspresji genem białka Cry pochodzącym z genomu *B. thuringiensis*). Podejście takie jest bardzo korzystne, można bowiem ograniczyć ekspresję toksyn jedynie do tkanek zagrożonych inwazją szkodników. Ponadto odporność na patogeny staje się dziedziczna, co ogranicza koszty ochrony uprawy [33].

Niebezpieczeństwem nabycia przez szkodniki odporności występuje również w przypadku wykorzystywania toksyn syntetyzowanych przez rośliny. Dlatego metoda syntezy bioinsektycydów w organizmach roślinnych (tak jak i podczas konwencjonalnego stosowania pestycydów) wymaga osiągnięcia na tyle wysokiej ekspresji białka (stężenia pestycydu), by wyeliminować osobniki heterozygotyczne pod względem odporności. Wówczas odporne homozygoty będą krzyżować się z osobnikami wrażliwymi, co wpłynie na opóźnienie wykształcenia się fenotypu odporności w populacji.

STRATEGIE ZAPOBIEGANIA NABYWANIU ODPORNOŚCI NA ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN

Wobec szybkiego nabycia odporności przez patogeny i szkodniki roślin, szczególnie najszybciej i najskuteczniej na działające selektywnie pestycydy organiczne, straty w uprawach są bardzo wysokie. Poszukuje się zatem strategii zapewniających ochronę przed wykształcaniem przez szkodniki odporności na środki ochrony roślin.

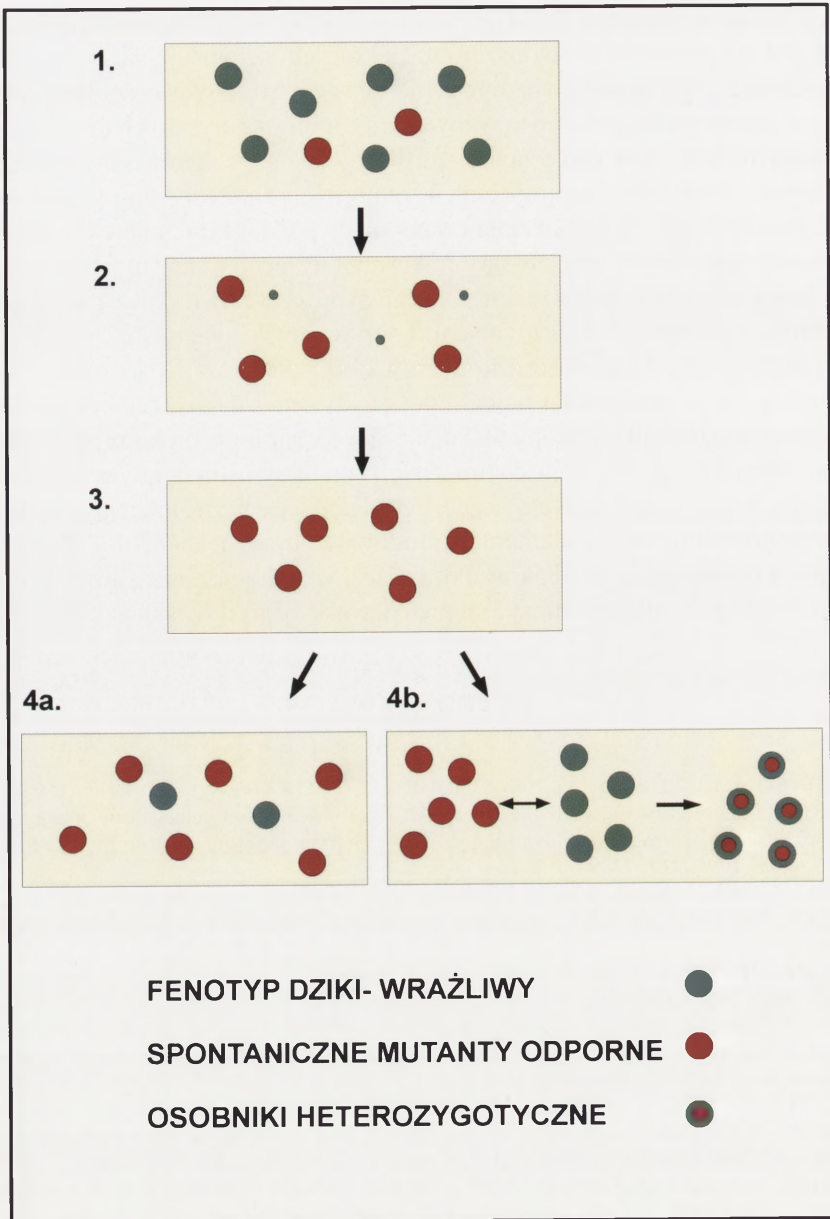
Zaleca się przede wszystkim stosowanie, zamiennie lub jednocześnie, kilku różnych metod zwalczania szkodników upraw, łączenie chemicznych i niechemicznych metod ochrony roślin, wykorzystanie naturalnych antagonistów patogena (biokontrola) oraz rotację upraw na danym obszarze. Odporności krzyżowej zapobiega stosowanie

mieszanek lub zamienne stosowanie pestycydów o różnym mechanizmie działania [12]. Zalecane jest też pozostawianie obszarów, na których nie stosuje się pestycydu, aby mogła przetrwać część populacji patogena niosąca geny wrażliwości na dany pestycyd. Zwiększa to prawdopodobieństwo krzyżowania się homozygotycznych form odpornych z homozygotami wrażliwymi, co zapobiega dryfowi genetycznemu prowadzącemu do wykształcenia form homozygotycznych, odpornych na stosowany środek [4]. Na rycinie 2. przedstawiono schemat zmian w populacji poddanej takiej presji selekcyjnej. Występowanie naturalnych wrogów szkodników upraw może w dużym stopniu wpływać na powodzenie strategii ochrony roślin. Nawet jedynie częściowo skuteczna biokontrola w połączeniu z metodami chemicznymi daje korzystny efekt synergistyczny, wpływając znacząco na obniżenie liczebności szkodników [39].

Wydaje się, że w przyszłości najbardziej efektywne i najszerzej stosowane będą tzw. zintegrowane techniki ochrony roślin, łączące technologie biokontroli ze stosowaniem biopestycydów, pestycydów chemicznych i odmian roślin uprawnych odpornych na pestycydy. Jest to podejście ekologiczne, uwzględniające liczne interakcje zachodzące między organizmami, wpływ elementów środowiska oraz mechanizmy adaptacyjne i ewolucyjne w populacjach szkodników. Poza znacznym ograniczeniem kosztów ochrony roślin techniki te pozwolą ograniczyć stopień dewastacji środowiska naturalnego [39].

LITERATURA

- [1] ALFONSO M, PUEYO JJ, GADDOUR K, ETIENNE A-L, KIRILOVSKY D, PICOREI R. Induced new mutation of D1 Serine-268 in soybean photosynthetic cell cultures produced atrazine resistance, increased stability of $S_2Q_B^-$, and $S_3Q_B^-$ states and increased sensitivity to light stress. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1499–1508.
- [2] BORECKI Z. Nauka o chorobach roślin. Państwowe Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa 2001.
- [3] BROGDON WG, McALLISTER JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 605–613.
- [4] CARRIERE Y, TABASHNIK BE. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proc R Soc Lond B* 2001; **268**: 1475–1480.
- [5] CHIN HG, KIM GD, MARIN I, MERSHA F, EVANS TC Jr., CHEN L, XU MQ, SRIHARSA P. Protein trans-splicing in transgenic plant chloroplast: Reconstruction of herbicide resistance from split genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4510–4515.
- [6] DEL CASTILLO FJ, DEL CASTILLO I, MORENO F. Construction and Characterization of Mutations at Codon 751 of the *Escherichia coli gyrB* Gene That Confer Resistance to the Antimicrobial Peptide Microcin B17 and Alter the Activity of DNA Gyrase. *J Bacter* 2001; **183**: 2137–2140.
- [7] DEGUCHI T, YASUDA M, NAKANO M, KANEMATSU E, OZEKI S, NISHINO Y, EZAKI T, MAEDA S-I, SAITO I, KAWADA Y. Rapid screening of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae parC* gene associated with resistance to quinolones. *J Clin Microb* 1997; **35**: 948–950.
- [8] DYER PS, HANSEN J, DELANEY A, LUCAS JA. Genetic control of resistance to the sterol 14 α -demethylase inhibitor fungicide prochloraz in the cereal eyespot pathogen *Tapesia yallundae*. *Appl Envir Microb* 2000; **66**: 4599–4604.
- [9] FALKINER FR. The consequences of antibiotic use in horticulture. *J Antimicrob Chemoth* 1998; **41**: 429–431.
- [10] FOURNIER D, BRIDE JM, HOFFMANN F, KARCH F. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14270–14274.
- [11] FOURNIER D, BRIDE JM, POIRIE M, BERGE JB, PLAPP FW Jr. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J Biol Chem* 1992; **3**: 1840–1845.



RYCINA 2. Presja selekcyjna wywierana na populację przez zastosowanie pestycydu i możliwość wpływania na rozwój odporności (wg [18], zmieniono): 1. Populacja w warunkach braku kontaktu z pestycydem; w populacji pierwotnej większość osobników jest wrażliwa. 2. Zastosowanie pestycydu – przeżywają i rozmnażają się tylko osobniki odporne. 3. Zaprzestanie stosowania środka – możliwe są min. 2 drogi rozwoju populacji. 4a. Dłuższy czas bez kontaktu z pestycydem – pojawiają się spontaniczne mutanty wrażliwe, w populacji obecnych jest dużo homozygot odpornych. Nastąpiła zmiana pierwotnej struktury populacji w kierunku fenotypu odporności. 4b. Rozwój sytuacji przy pozostawieniu obszarów, na których nie stosowano pestycydu – możliwe jest krzyżowanie się homozygot odpornych z wrażliwymi homozygotami z terenów, na których nie stosowano środków ochrony roślin. Powstaje struktura populacji sprzyjająca odrodzeniu się fenotypu wrażliwości.

- [12] GAWROŃSKI SW. Chwasty odporne: mechanizm odporności, rozprzestrzenianie i zapobieganie wystąpieniu. XLV Sesja Naukowa IOR 2005.
- [13] GIRVAN MS, BULLIMORE J, BALL AS, PRETTY JN, OSBORN MA. Responses of active bacterial and fungal communities in soil under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl Environ Microb* 2004; **70**: 2692–2701.
- [14] GULLNER G, KÖMIVES T, RENNENBERG H. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase towards chloracetanilide herbicides. *J Exp Bot* 2001; **52**: 971–979.
- [15] HARBORNE JB. Ekologia biochemiczna. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [16] HU M, NANADI S, DAVIES C, NICHOLAS RA. High level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rps-J* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. *Antimicrob Agents Ch* 2005; **49**: 4327–4334.
- [17] KANG TJ, SEO JE, LOC NH, YANG MS. Herbicide resistance of tobacco chloroplasts expressing the *bar* gene. *Molec Cells* 2003; **16**: 60–66.
- [18] KHACHATOURIANS GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canad Med Assoc J* 1998; **159**: 1129–1136.
- [19] LERMONTOVA I, GRIMM B. Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. *Plant Physiol* 2000; **122**: 75–83.
- [20] LEVIN BR, PERROT V, WALKER N. Compensatory mutations and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 2000; **154**: 985–997.
- [21] LUTZ KA, KNAPP JE, MALIGA P. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1585–1590.
- [22] LYR H, LAUSSMANN B, CASPERSON G. Mechanism of action of terrazol. *Z Allg Mikrobiol* 1975; **15**: 345–355.
- [23] MIYO T, OGUMA Y, CHARLESWORTH B. The comparison of intrinsic rates of increase among chromosome-substituted lines resistant and susceptible to organophosphate insecticides in *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet Syst* 2000; **78**: 373–382.
- [24] MOUCHES C, PASTEUR N, BERGE JB, HYRIEN O, RAYMOND M, de SAINT VINCENT BR, de SILVESTRI M, GEORGHIOU GP. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex mosquito*. *Science* 1996; **233**: 778–780.
- [25] NAKANO M, DEGUCHI T, KAWAMURA T, YASUDA M, KIMURA M, OKANO Y, KAWADA Y. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* 1997; **41**: 2289–2291.
- [26] NEWCOMB RD, CAMPBELL PM, OLLIS DL, CHEAH E, RUSSELL RJ, OAKESHOTT JG. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7464–7468.
- [27] PEREWOSKA I, ETIENNE A-L, MIRANDA T, KIRILOVSKY D. S₁ destabilization and higher sensitivity to light in metribuzin-resistant mutants. *Plant Physiol* 1994; **104**: 235–245.
- [28] PULLIN AS. Biologiczne podstawy ochrony przyrody. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2004.
- [29] QUINLIVAN EP, McPARTLIN J, WEIR DG, SCOTT J. Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *FASEB J* 2000; **14**: 2519–2524.
- [30] RUPIŃSKI S. Substancja z licencją na zabijanie. *Chem Rev* 2004; **4**: 25–32.
- [31] SAJJAPHAN K, SHAPIR N, JUDD AK, WACKETT LP, SADOWSKY MJ. Novel *psbA1* gene from a naturally occurring atrazine-resistant cyanobacterial isolate. *Appl Environ Microb* 2002; **68**: 1358–1366.
- [32] SCHEIBLE WR, ESHED R, RICHMOND T, DELMER D, SOMERVILLE C. Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis lxr1* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10079–10084.
- [33] SCHNEPF E, CRICKMORE N, van RIE J, LERECLUS D, BAUM J, FEITELSON J, ZEIGLER DR, DEAN DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microb Mol Biol Rev* 1998; **62**: 775–806.
- [34] SHAFER TJ, MEYER DA, CROFTON KM. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 2005; **113**: 123–136.
- [35] SHI MA, LOUGARRE A, ALIES C, FRÉMAUX I, TANG ZH, STOJAN J, FOURNIER D. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol Biol* 2004; **4**: 5.

- [36] SIMINSZKY B, CORBIN FT, WARD ER, FLEISCHMANN TJ, DEWEY RE. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1750–1755.
- [37] SMEDA RJ, HASEGAWA PM, GOLDSBROUGH PB, SINGH NK, WELLER SC. A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity. *Plant Physiol* 1993; **103**: 911–917.
- [38] SUN L, GHOSH I, PAULUS H, XU MING-QUN. Protein *trans*-splicing to produce herbicide-resistant acetolactate synthase. *Appl Envir Microb* 2001; **67**: 1025–1029.
- [39] THOMAS MB. Ecological approaches and the development of „truly integrated” pest management. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5944–5951.
- [40] TO MS, FAVRIN S, ROMANOVA N, GRIFFITHS MW. Postadapational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Envir Microb* 2002; **68**: 5258–5264.
- [41] TOKARSKA-RODAK M, TOŚ-LUTY S, HARATYIM-MAJ AN. Selected parameters of immunological response in hop growers during the period of intensive application of pesticides. *Ann Agric Environ Med* 2004; **11**: 227–231.
- [42] WANG XIU-HONG, SMITH ROSS, FLETCHER JAMIE I, WILSON HARRY, WOOD CHRIS J, HOWDEN MERLIN E H, KING GLENN F. Structure-function studies of ω -atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels. *Eur J Biochem* 1999; **264**: 488–494.
- [43] www.bayercs.pl
- [44] ZAGNITKO O, JELENSKA J, TEVZADZE G, HASELKORN R, GORNOCKI P. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6617–6622.
- [45] ZHANG Y, LAMM R, PILLONEL C, LAM S, XU JIN-RONG. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a *HOG1* mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Envir Microb* 2002; **68**: 532–538.
- [46] ZHU YC, SNODGRASS GL. Cytochrome P450 CYP6X1 cDNAs and mRNA expression levels in three strains of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (*Heteroptera: Miridae*) having different susceptibilities to pyrethroid insecticide. *Insect Mol Biol* 2003; **12**: 39–49.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 15.09.2005 r.

Przyjęto: 25.01.2006 r.

ul. Miczurina 20 60-318 Poznań

e-mail: AO.Stepłowska@ior.poznan.pl

ZALEŻNA OD UBIKWITYNY PROTEOLIZA BIAŁEK W REGULACJI PROCESÓW WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN*

UBIQUITIN-MEDIATED PROTEOLYSIS OF PROTEINS
IN REGULATION OF PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT

Tomasz HEJKA, Stanisław KOWALCZYK

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

Streszczenie: Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera ponad 1300 genów (~5% proteomu) kodujących poszczególne elementy układu ubikwityna/proteasom 26S, z czego około 90% koduje mono- i oligomeryczne ligazy ubikwitynowe E3 odpowiedzialne za swoiste rozpoznanie białek kierowanych do degradacji. Roślinne ligazy E3 tworzą zróżnicowaną rodzinę białek lub kompleksów białkowych z charakterystycznymi domenami RING-finger, U-box lub HECT. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują, że zależna od ubikwityny degradacja białek odgrywa kluczową rolę w sygnalizacji hormonalnej i samonieźgodności, reguluje fotomorfogenezę oraz kontroluje reakcje obronne przeciw patogenom.

Słowa kluczowe: proteoliza, ubikwityna, ligazy ubikwitynowe, fitohormony, fotomorfogeneza, samonieźgodność, patogenezę.

Summary: In *Arabidopsis thaliana* more than 1300 genes (~5% of the proteome) encode components of the ubiquitin/26S proteasome pathway. Approximately 90% of these genes encode subunits of the E3 ubiquitin ligases, which confer substrate specificity to the ubiquitin/26S proteasome pathway. The plant E3 ubiquitin ligases comprise a large and diverse family of proteins or protein complexes containing a RING-finger, U-box domain or a HECT domain. Within the past several years, considerable progress has been achieved in understanding the role of protein degradation via the ubiquitin-proteasome pathway in hormone responses, self-incompatibility, photomorphogenesis and pathogen defenses.

Key words: proteolysis, ubiquitin, ubiquitin ligases, phytohormones, photomorphogenesis, self-incompatibility, pathogenesis.

*Artykuł jest skróconą wersją pracy licencjackiej T. H.

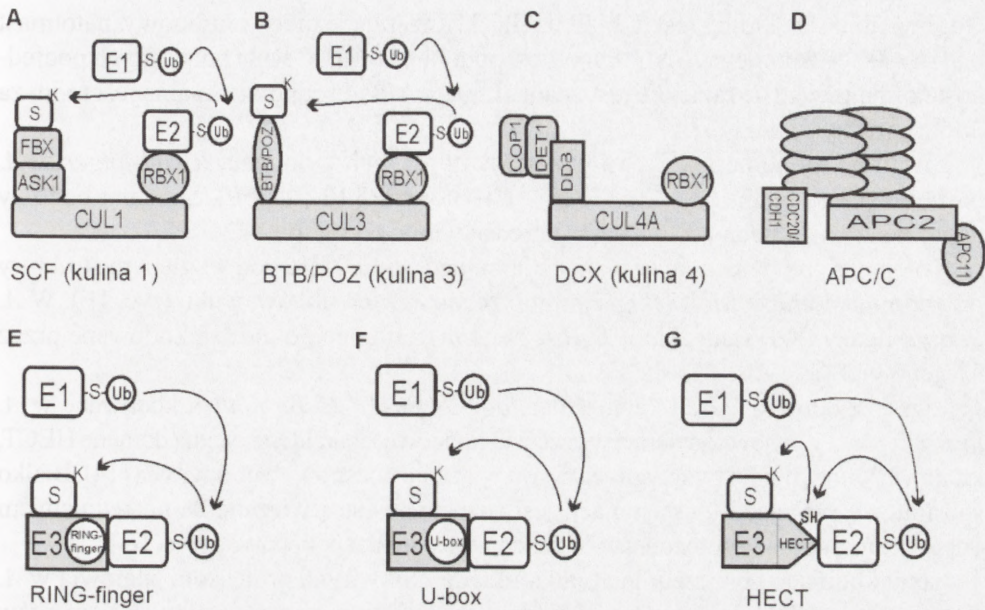
1. WSTĘP

Selektywna ubikwitynacja białek kontroluje degradację specyficznych białek oraz reguluje szereg procesów niezwiązanych z proteolizą, takich jak np. endocytoza i sortowanie pęcherzyków błonowych, transkrypcja, naprawa DNA czy aktywacja kinaz białkowych. O ważności tych procesów świadczy przyznanie w 2004 roku nagrody Nobla z dziedziny chemii badaczom, którzy odkryli ubikwitynację białek. Sylwetki laureatów oraz niektóre aktualne kierunki poszukiwań związanych z ubikwitynacją białek zostały ostatnio przedstawione na łamach Postępów Biologii Komórki [19]. Najnowsze badania z zakresu biologii molekularnej roślin przyniosły również szereg bardzo interesujących wyników wskazujących, że niemal wszystkie procesy związane ze wzrostem i rozwojem rośliny są regulowane za pośrednictwem układu ubikwityna/proteasom 26S [45,55]. Wyniki dotychczasowych badań pokazują, że układy selektywnej ubikwitynacji białek są kluczowymi elementami szlaków sygnałowych aktywowanych przez fitohormony, biorą udział w regulacji fotomorfogenezy i samonieczgodności, kontrolują procesy obronne przeciw patogenom oraz uczestniczą w regulacji wielu innych procesów zachodzących w roślinach.

2. ROŚLINNE UKŁADY UBIKWITYNACJI BIAŁEK

Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera 14 genów poliubikwitynowych (*UBQ*) kodujących w sumie 30 jednostek ubikwityny, kilka białek podobnych do ubikwityny RUB (ang. *Related to Ubiquitin*) oraz dwa małe białka rybosomowe [34,59]. W przyłączaniu ubikwityny do białka substratowego uczestniczą trzy enzymy tworzące tzw. kaskadę enzymów ubikwitynujących. Enzym aktywujący ubikwitynę E1 kodowany jest w *A. thaliana* przez dwa geny *UBA*, enzymy koniugujące E2 przez 37 genów *UBC*, a ligazy lub podjednostki wielobiałkowych kompleksów ligaz ubikwitynowych koduje około 1300 genów [59]. Roślinne ligazy ubikwitynowe z domeną *RING-finger* (ang. *Real Interesting New Gene*) i strukturalnie podobną kasetą *U-box* oraz ligazy z domeną HECT (ang. *Homology to E6-AP C-Terminus*) przenoszą ubikwitynę z E2 na białko substratowe (ryc. 1) [55, 64].

W większości dotychczas poznanych roślinnych procesów regulowanych w drodze ubikwitynacji białek uczestniczą wielopodjednostkowe ligazy typu SCF (ang. *Skp1-Cullin-F-box Proteins*) zbudowane co najmniej z czterech różnych białek (ryc. 1A). Rusztowanie dla całego kompleksu tworzy białko nazywane kulina, które poprzez domenę C-kończową wiąże białko RBX zawierające domenę *RING-finger*, a poprzez domenę N-kończową białko SKP (w *A. thaliana* określane akronimem ASK). Domena *RING-finger* w białku RBX oddziałuje z enzymem koniugującym E2, a białko ASK/SKP wiąże jedno z wielu białek FBX z kasetą F, które pośredniczy w wiązaniu białka przeznaczonego do ubikwitynacji [35,55]. W *A. thaliana* zidentyfikowano 11 genów kodujących kuliny, dwa geny *RBX*, 21 genów *ASK* i około 700 genów *FBX* [35,59].



RYCINA 1. Schemat budowy roślinnych ligaz ubikwitynowych. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [45,55,64])

Aktywność wszystkich ligaz zawierających kulinę jest regulowana w drodze odwracalnej rubinylicacji/nedylacji kuliny, w której uczestniczą enzymy odpowiedzialne za przyłączenie do kuliny białka podobnego do ubikwityny RUB/NEDD8 oraz kompleks CSN (sygnalosomal COP9) funkcjonujący m.in. w derubinylicacji ligaz [22,50]. Ponadto w regulacji ligaz kulinowych typu SCF biorą udział białka CANDY1 i SGT [34].

W drugim typie ligaz zawierających kulinę zamiast białek ASK/SKP i FBX występuje białko z domeną BTB/POZ (ang. *Broad Complex, Tramtrack, Bric-a-brac/Pox virus and Zinc finger*), które pełni funkcję białka adaptorowego wiążącego białko przeznaczone do ubikwitynacji. Białko BTB/POZ oddziałuje z kuliną 3 (w *A. thaliana* AtCUL 3a lub AtCUL 3b), do której wiąże się także białko RBX (ryc. 1B). [12,71]. Na razie nie wiemy jeszcze, czy każde z 76 białek z domeną BTP/POZ w *A. thaliana* wchodzi w skład ligaz typu AtCUL3-RBX1-BTB, tak jak to jest w przypadku ETO1, które funkcjonuje w ligazie regulującej biosyntezę etylenu (patrz rozdz. 7) [6].

Inny typ ligazy ubikwitynowej tworzy białko COP1 *A. thaliana* (ang. *Constitutively Photomorphogenic 1*) z domeną *RING-finger* uważane do niedawna za monomeryczną ligazę E3 [22]. Najnowsze doniesienia sugerują, że COP1, podobnie jak poznany niedawno ludzki homolog tego białka [13], jest podjednostką ligazy zbudowanej także z udziałem kuliny [26,55,64]. Ligazę tego typu tworzy białko z domeną DDB1 (ang. *DNA Damage Binding protein 1*) wiążące białka DET1 i COP1 oraz białko RBX oddziałujące z kuliną 4 (ryc. 1C).

Wielopodjednostkową ligazą jest także kompleks APC/C (ang. *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) zbudowany co najmniej z 11 białek (ryc. 1D) [45,55,59].

Odpowiednikiem kuliny jest tu białko APC2 zawierające motyw kulinowy, natomiast białko APC11 z domeną *RING-finger* jest podobne do RBX. Rola pozostałych podjednostek kompleksu na razie nie jest znana. Ligaza APC/C odpowiedzialna jest m.in. za ubikwitynację cyklin [45].

Do grupy monomerycznych ligaz ubikwitynowych z domeną *RING-finger* w *A. thaliana* należą białka SINAT5, HOS1, CIP8 oraz PRT1 [45, 59]. Schemat budowy takiej ligazy z domeną *RING-finger* przedstawiono na rycinie 1E.

Kolejną grupę ligaz tworzą białka z domeną *U-box*, która pod względem struktury przypomina domenę *RING-finger*, mimo że nie zawiera jonów cynku (ryc. 1F). W *A. thaliana* ligazy PUB (ang. *Plant U-Box Protein*) z domeną *U-box* są kodowane przez 41 genów [34].

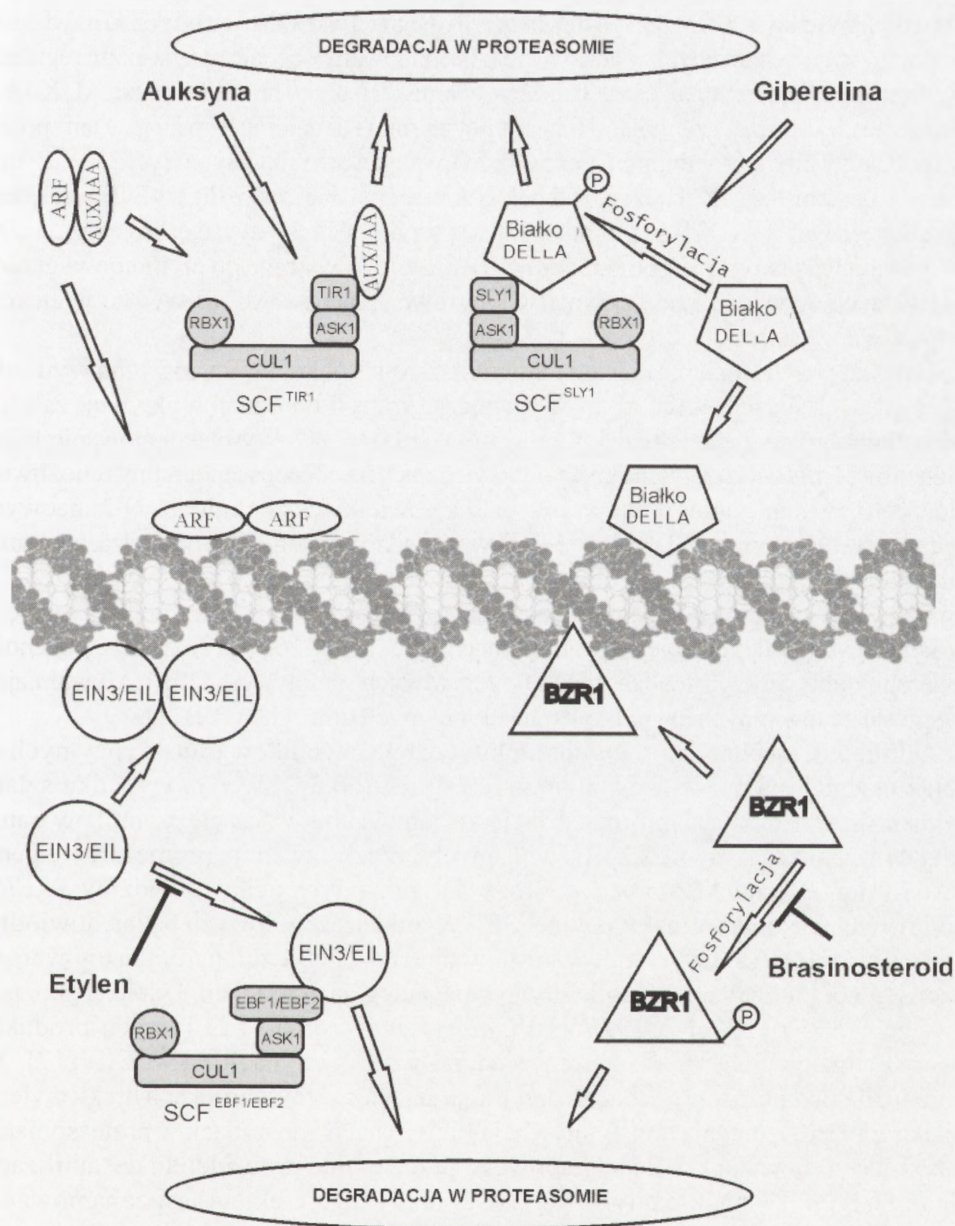
Ligazy z domeną HECT (ang. *Homology to E6-AP C-Terminus*), kodowane w *A. thaliana* przez 7 genów, zawierają w części C-końcowej charakterystyczną domenę HECT, która wiąże enzym E2 i tworzy przejściowe wiązanie tioestrowe z ubikwityną [14]. Białko substratowe ulegające ubikwitynacji jest rozpoznawane i wiązane za pośrednictwem odpowiedniej domeny położonej w N-końcowym odcinku polipeptydu (ryc. 1G).

Geny kodujące poszczególne białka układu ubikwityna/proteasom stanowią w *A. thaliana* ponad 5% całego genomu. Tak duże zróżnicowanie poszczególnych elementów układu, w tym również enzymów deubikwitynujących i białek budujących proteasom 26S, a także wielka różnorodność białek regulatorowych i białek współdziałających z ligazami świadczą o tym, że układ ubikwityna/proteasom 26S gra kluczową rolę w regulacji wielu procesów życiowych rośliny.

3. UBIKWITYNACJA CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH KOŃCOWYM OGNIWEM SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH AKTYWOWANYCH PRZEZ FITOHORMONY

Wyniki badań z ostatnich lat pokazały, że zależna od ubikwityny degradacja białek funkcjonujących w regulacji transkrypcji genów jest jednym z kluczowych elementów hormonalnych szlaków sygnałowych. Badaniom tym poświęcono artykuł opublikowany w *Postęпах Biochemii* [34], a także prace przeglądowe dostępne w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym [45,55].

Znaczenie ubikwitynacji białek w sygnalizacji hormonalnej najpełniej poznano w przypadku szlaku zależnego od auksyny [5,11]. W odpowiedziach rośliny na ten fitohormon układ ubikwityna/proteasom 26S jest odpowiedzialny za ubikwitynację białek represorowych AUX/IAA, które mogą tworzyć heterodimery z czynnikami transkrypcyjnymi ARF (ang. *Auxin Response Factor*) (ryc. 2) [72]. Białka ARF mają domenę wiążącą DNA oraz charakterystyczny motyw, od którego zależy, czy dane białko aktywuje, czy hamuje geny regulowane przez auksynę [34]. Ekspresja genów *ARF* nie jest zależna od obecności fitohormonu, natomiast poziom co najmniej pięciu z 23 transkryptów *ARF* mRNA w *A. thaliana* jest regulowany przez mikroRNA [15,42].



RYCINA 2. Kontrolowana przez fitohormony ubikwitynacja białek regulujących ekspresję genów. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [1,5,11,16,20,37,70])

Białka AUX/IAA są wiązane przez białko TIR1 (ang. *Transport Inhibitor Response 1*), jedno z ponad 700 białek z domeną F tworzących ligazy typu SCF [34]. Doniesienia z ostatnich miesięcy sugerują, że TIR1 nie tylko rozpoznaje i wiąże określone białko(a) AUX/IAA, ale jest także receptorem auksyny [9,10,33]. Potwierdzenie receptorowej funkcji TIR1 oraz jego homologów AFB1, 2 i 3 (ang. *Auxin Signaling F-box protein*)

[9,10] byłoby jednym z bardziej spektakularnych osiągnięć w trwających od ponad trzydziestu lat poszukiwaniach receptorów auksyn [75]. Proponowany obecnie mechanizm regulacji ekspresji genów przez auksynę zakłada, że w warunkach braku hormonu białka AUX/IAA tworzą heterodimery z czynnikami transkrypcyjnymi ARF uniemożliwiając w ten sposób ich oddziaływanie z promotorami genów regulowanych przez auksynę (ryc. 2). Wiązanie auksyny przez białko TIR1 bądź jego homologi zmienia powinowactwo ligazy SCF względem określonego białka AUX/IAA promując w ten sposób jego ubikwitynację. Proteoliza AUX/IAA umożliwia tworzenie homodimerów ARF, które są wiązane do promotorów genów pierwotnych odpowiedzi na auksynę (w tym również genów AUX/IAA), co w efekcie prowadzi do aktywacji bądź represji tych genów.

Badania poświęcone poznawaniu giberelinowych szlaków sygnałowych przyniosły szereg danych świadczących o tym, że również ta grupa fitohormonów aktywuje zależną od ubikwityny degradację białek represorowych [1,16,34]. Wyselekcjonowanie kilku mutantów *A. thaliana* o zmienionych odpowiedziach na obecność gibereliny umożliwiło zidentyfikowanie genów kodujących białka zawierające w regionie N-końcowym charakterystyczny motyw DELLA [34]. Wyniki badań z ostatnich lat dowodzą, że sygnał giberelinowy aktywuje kinazę białkową, która fosforyluje białko z motywem DELLA umożliwiając w ten sposób jego rozpoznanie przez ligazy SCF^{SLY1/SNE}, ubikwitynację, a w konsekwencji degradację w proteasomach (ryc. 2). [1,16,34]. Tak więc, obecność gibereliny aktywuje proteolizę białek represorowych z motywem DELLA uwalniając ekspresję genów innych czynników transkrypcyjnych m.in. GAMYB [1].

Odmienne mechanizmy regulują ubikwitynację czynników transkrypcyjnych w szlaku sygnałowym aktywowanym przez etylen [20,34]. W tym wypadku szlaki sygnałowe przekazujące informację do jądra hamują ubikwitynację czynników transkrypcyjnych z rodziny EIN3/EIL wiązanych przez sekwencje promotorowe genu *ERF1* (ang. *Ethylene Responsive Factor 1*) oraz innych genów z rodziny *EREBP* kodujących czynniki transkrypcyjne [35]. Wyniki szczegółowych badań dowiodły, że poziom EIN3/EIL wyraźnie wzrasta w obecności etylenu, natomiast w warunkach jego braku białka te są ubikwitynowane i ulegają degradacji. Udało się poznać dwa geny *EBF1* i *EBF2* (ang. *EIN3-Binding F-box protein 1* i *2*), których produkty tworzą ligazy SCF^{EBF1/EBF2} biorące udział w ubikwitynacji EIN3/EIL [17]. W konkluzji dotychczasowych badań przyjmuje się więc, że w warunkach braku etylenu białka EIN3/EIL ulegają konstytutywnej ubikwitynacji i degradacji w proteasomach, natomiast aktywacja szlaku sygnałowego przez etylen prowadzi do destabilizacji ligaz SCF^{EBF1/EBF2} bądź modyfikacji EIN3/EIL, czego efektem jest zahamowanie ich ubikwitynacji (ryc. 2). Białka EIN3/EIL jako pozytywne elementy etylenowych szlaków sygnałowych aktywują gen *ERF1* oraz inne geny *EREBP*, których produkty regulują ekspresję genów tzw. wtórnych odpowiedzi na etylen [34].

Wyniki najnowszych badań sugerują, że również w przypadku brassinosteroidów sygnał hormonalny zapobiega degradacji czynników transkrypcyjnych BZR1 i BZR2/BES1 (ang. *Brassinazole Resistant 1/BRI1-Suppressor 1*) [37,70]. W tym wypadku związanie brassinosteroidu przez kompleks heterodimerskiej kinazy białkowej BRI1/BAK1 prowadzi do zahamowania aktywności cytoplazmatycznej kinazy białkowej BIN2, która fosforyluje białka BZR1 i BES1, a przypuszczalnie także białka BEH1 do 4 [38].

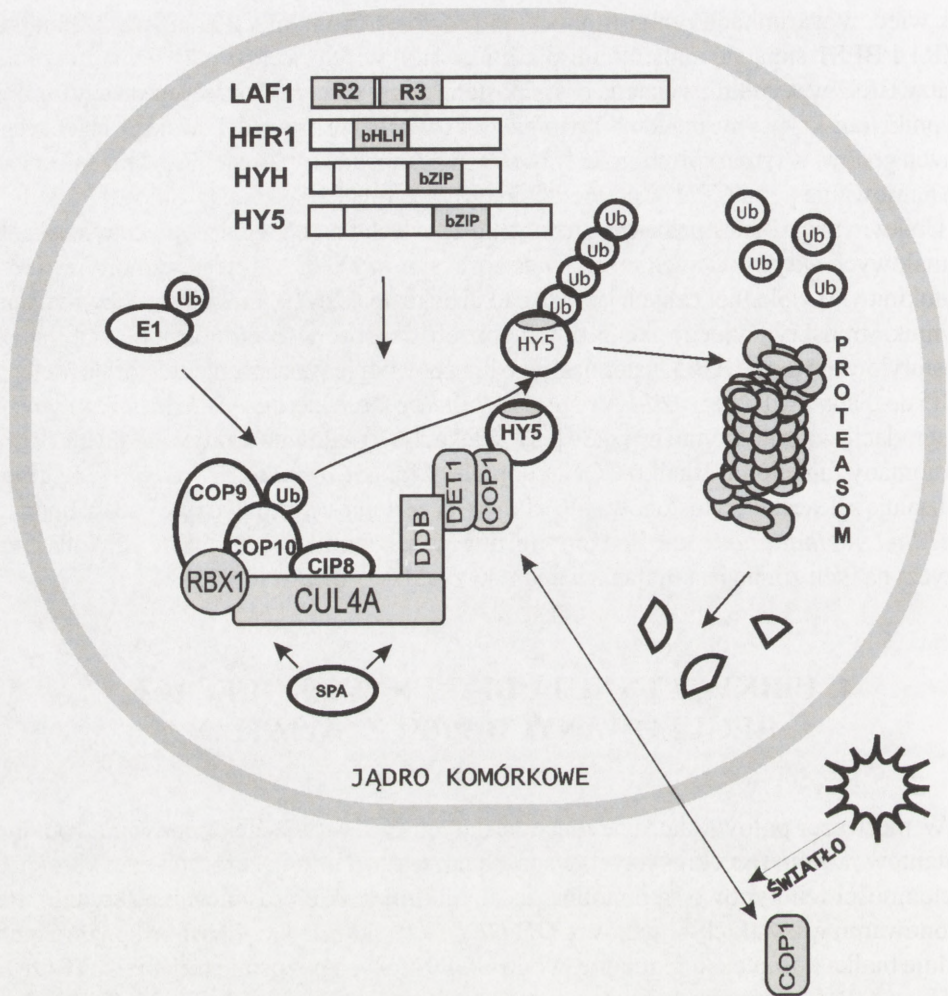
Tak więc, w warunkach braku fitohormonu fosforylowane przez kinazę BIN2 białka BZR1 i BES1 stają się substratami dla ligazy ubikwitynowej (ryc.2). Zahamowanie kinazy BIN2 w wyniku związania brassinosteroidu przez kompleks receptorowy chroni czynniki transkrypcyjne przed ubikwitynacją, co w efekcie prowadzi do aktywacji określonych genów, w tym m.in. genu *SAUR-AC1* związanego ze wzrostem wydłużeniowym lub hamowania genu *CPD* odpowiedzialnego za syntezę brassinosteroidów [37,38].

Ubikwitynacja białek pełni także jedną z kluczowych funkcji regulacyjnych w szlakach sygnałowych aktywowanych przez kwas abscysynowy (ABA), kwas jasmonowy (JA) i cytokininy. Wyniki nielicznych jeszcze badań pokazują, że ABA reguluje ubikwitynację czynnika transkrypcyjnego ABI5 w ten sposób, że obecność fitohormonu stabilizuje ufosforylowaną formę ABI5, natomiast jego brak powoduje wiązanie nieufosforylowanego ABI5 do białka AFP (ang. *ABI Five binding Protein*), które kieruje ABI5 do ubikwitynacji i degradacji w proteasomach [24,34]. W szlakach sygnałowych aktywowanych przez jasmoniany funkcjonuje białko COI1 z domeną F (ang. *Coronatine Insensitive 1*), które oddziałuje z deacetylazą histonową [40]. Pojedyncze doniesienie dotyczące badań mutantu *rpn12a-1 A. thaliana* z upośledzonymi odpowiedziami na cytokininy dowodzi, że przyczyną tych zmian jest mutacja w jednym z białek proteasomu [59].

4. UBIKWITYNACJA BIAŁEK W PROCESACH REGULOWANYCH PRZEZ ŚWIATŁO

W pierwszej połowie lat dziewięćdziesiątych XX w. wyselekcjonowano rodzinę mutantów *A. thaliana* określanych wspólną nazwą *cop/det/fus*, których siewki rosnąc w ciemności fenotypowo są podobne do roślin linii dzikich rosnących na świetle. Po sklonowaniu wszystkich 11 genów *COP/DET/FUS* okazało się, że osiem spośród nich koduje białka kompleksu regulatorowego COP9/CSN, a pozostałe trzy białka (COP1, DET1, COP10) bezpośrednio uczestniczą w ubikwitynacji białek [22,26,45]. Białko COP1 z domeną *RING-finger* było początkowo uważane za ligazę ubikwitynową typu monomerycznego, jednak obecnie przyjmuje się, że COP1 *A. thaliana*, podobnie jak poznane niedawno ludzkie białko COP1, jest jedną z podjednostek ligazy zbudowanej z udziałem kulininy 4 [26,55,64,73]. Ligazę tego typu tworzy białko z domeną DDB1 (ang. *DNA Damage Binding protein 1*) wiążące białka DET1 i COP1 oraz wiązane przez kulinę 4 białko RBX (ryc. 3). Z kompleksem ligazy COP1 oddziałują białka CIP8, COP10, SPA i sygnałom COP9 [22]. W doświadczeniach wykorzystujących technikę mikromacierzy DNA wykazano, że w *A. thaliana* ligaza COP1 pośredniczy w regulacji ponad 20% genów [41]. Wyniki te dowodzą, że COP1 jest kluczowym elementem mechanizmu regulującego ekspresję genów kontrolowanych przez światło.

Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że ligaza zawierająca COP1 pośredniczy w ubikwitynacji czynników transkrypcyjnych HY5 i HYH z motywem bZIP [7,22], czynnika transkrypcyjnego HFR1 z motywem bHLH [30,74], białka LAF1 z rodziny czynników transkrypcyjnych MYB-R2R3 [57], a także fitochromu A – fotoreceptora



RYCINA 3. Regulowana przez światło ubiquitynacja czynników transkrypcyjnych. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [22,26,45,55])

światła czerwonego i dalekiej czerwieni [56]. Aktywność ligazy COP1 regulują cztery białka z rodziny SPA1 (ang. *Suppressor of PhyA-105*), kryptochromy, a przypuszczalnie także fitochromy [27,36]. Doświadczenia z wykorzystaniem chimery COP1 z GFP pokazały, że w komórkach rośliny rosnącej w ciemności COP1 jest zlokalizowane w jądrze, natomiast w roślinie wystawionej na światło COP1 migruje do cytoplazmy [61]. Wymuszony przez światło transport COP1 z jądra do cytoplazmy zapobiega ubiquitynacji czynników transkrypcyjnych, które aktywują geny regulowane przez światło. Tak więc, kontrolowana przez światło zmiana subkomórkowej lokalizacji COP1 jest istotnym elementem mechanizmu regulującego wewnątrzjądrowy poziom czynników transkrypcyjnych. Mechanizm kontrolowanej przez światło migracji COP1 między jądrem a cytoplazmą nie jest dokładnie poznany, chociaż wiadomo, że uczestniczą w nim fitochromy A i B, kryptochrom 1 oraz kompleks COP9 [45].

W badaniach poświęconych molekularnemu mechanizmowi zegara biologicznego poznano gen *ZTL* (ang. *Zeitlupe*) *A. thaliana* kodujący polipeptyd, który w części N-końcowej ma domenę LOV wiążącą nukleotyd flawinowy (FMN), w części środkowej motyw kasety F, a w regionie C-końcowym powtórzenia motywu odpowiedzialnego za oddziaływanie z innymi białkami. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano dwa inne geny (*FKF1*; ang. *Flavin-binding, Kelch repeat, F box* i *LKP2*; ang. *LOV Kelch Protein 2*) kodujące białka homologiczne z *ZTL* [23]. Obecność we wszystkich trzech białkach domeny LOV wiążącej FMN oraz kasety F sugeruje, że są one receptorami flawoproteinowymi wchodzącymi w skład różnych kompleksów ligaz ubikwitynowych typu SCF [28]. Wyniki ostatnich badań potwierdzają to przypuszczenie, bowiem wykazano, że ligaza typu SCF^{ZTL} bierze udział w ubikwitynacji białka TOC1/APRR1, jednego z elementów zegara komórkowego [21,43], natomiast białko *FKF1* funkcjonuje w zależnej od światła regulacji ekspresji genu *CO* (*CONSTANS*), którego produkt gra ważną rolę w fotoperiodycznej indukcji kwitnienia [28].

5. UBIKWITYNACJA BIAŁEK W SAMONIEZGODNOŚCI HOMOMORFICZNEJ

Samonie zgodność homomorficzna jest mechanizmem kontrolowanym genetycznie umożliwiającym selekcję pyłków padających na znamię słupka w celu niedopuszczenia do zapłodnienia przez własny pyłek. W pracy opublikowanej niedawno w *Kosmosie* przedstawiono podstawowe założenia mechanizmów samonie zgodności sporofitowej i gametofitowej [4]. Kluczowymi elementami obu mechanizmów są układy pośredniczące w ubikwitynacji białek, które w samonie zgodności sporofitowej biorą udział w reakcji odrzucenia pyłku o niewłaściwym haplotypie [25,32,63], a w samonie zgodności gametofitowej uczestniczą zarówno w reakcji rozpoznania, jak również w reakcji odpowiedzi przeciwdziałającej zapłodnieniu wsobnemu [31,44].

W przypadku samonie zgodności sporofitowej, badanej głównie w roślinach z rodziny *Brassicaceae*, w reakcji rozpoznania pyłku pośredniczą białka SRK i SLG, produkty genów tzw. locus S. W błonie komórek wyrostkowych znamienia tworzą one kompleks receptorowy rozpoznający specyficzny oligopeptyd SCR/SP11 pochodzący z pyłku osiadłego na znamieniu, który został wbudowany na jego powierzchnię w pylniku przez komórki tapetum. Białko SRK jest receptorową transbłonową serynowo/treoninową kinazą białkową, natomiast SLG jest sekrecyjną glikoproteiną, której rola w reakcji rozpoznania męskiej determinanty samonie zgodności nie jest do końca poznana [25,32,63]. Aktywność kinazy białkowej SRK jest blokowana przez tioredoksynę (THL1 i THL2) wiążącą się z resztą cysteiny położoną w regionie transbłonowym SRK [63]. Dodatkowym elementem układu receptorowego współdziałającym z kompleksem SRK jest kinaza serynowo/treoninowa MLPK (ang. *M Locus Protein Kinase*) zakotwiczona w błonie komórkowej po stronie cytoplazmatycznej [46]. Wewnątrzkomórkowa domena receptora SRK oddziałuje z ligazą ubikwitynową ARC1 (ang. *Arm Repeat-Containing*

Protein 1) zawierającą domenę *U-box* [60]. Fosforylacja ARC1 przez kompleks receptorowy SRK/MLPK aktywuje mechanizm odpowiedzialny za odrzucenie pyłku o niewłaściwym haplocyocie. W warunkach, gdy kompleks receptorowy nie ulega aktywacji, a więc również w sytuacji, gdy na znamieniu osiadzie obcy pyłek, tioredoksyna zapobiega autofosforylacji kompleksu receptorowego. Tak więc ligaza ARC1 w samoniezgodności sporofitowej gra rolę pozytywnego elementu w szlaku aktywowanym w warunkach samozapylenia, a jej fosforylacja przez aktywny kompleks SRK(SLG)-MLPK uruchamia mechanizm zapobiegający kiełkowaniu łagiewki pyłkowej. Znalezienie białka substratowego ubikwitynowanego przez ARC1 powinno w przyszłości pomóc w rozszyfrowaniu mechanizmu zaangażowanego w eliminowanie pyłku o niewłaściwym haplocyocie.

W samoniezgodności gametofitowej, badanej u przedstawicieli *Solanaceae*, *Rosaceae* i *Scrophulariaceae*, reakcja rozpoznania zachodzi pomiędzy rybonukleazą (S-RNaza) kodowaną przez gen locus S, którego ekspresja zachodzi w komórkach szyjki słupka, a zidentyfikowanym ostatnio białkiem SLF/SFB, produktem genu locus S w pyłku [31,44]. Białko SLF/SFB (ang. *S-Locus F-box/S-haplotype-specific F-box*) zawiera kasetę F i jak wykazały ostatnie badania, oddziałuje z białkami współtworzącymi ligazę ubikwitynową typu SCF [52]. Wiadomo też, że białko SLF/SFP oddziałuje z S-RNazą, niezależnie od kodujących je haplocyoców genu, kierując ją do ubikwitynacji. O zaangażowaniu proteasomów w proteolizę S-RNazy świadczy m.in. hamowanie jej degradacji przez inhibitory proteasomów [53]. W świetle wyników ostatnich badań wydaje się więc, że S-RNaza (u heterozygot produkty obu alleli genu S w diploidalnej tkance sporofitu) przenika niespecyficznie z apoplastu do rosnącej łagiewki zarówno pyłku zgodnego, jak i niezgodnego. W łagiewce obcego pyłku (zgodnego) obie S-RNazy są rozpoznawane przez SLF/SFP i ulegają proteolitycznej degradacji, co zapobiega trawieniu rRNA i umożliwia kontynuowanie wzrostu łagiewki w kierunku zalążni. W łagiewce pyłku niezgodnego białko SLF/SFP jest produktem genu S haploidalnego genomu pyłku o haplocyocie odpowiadającym jednemu z dwóch allelicznych genów kodujących S-RNazę [31,44]. W wyniku swoistej interakcji obu tych białek pyłek zostaje rozpoznany jako niezgodny, a w efekcie jedna z S-RNaz pozostaje nienaruszona. Obecność aktywnej S-RNazy w łagiewce prowadzi do strawienia rRNA i zahamowania jej dalszego wzrostu [52,53,58,67]. Proponowany obecnie mechanizm samoniezgodności gametofitowej wydaje się bardzo prawdopodobny, chociaż szereg jego elementów wymaga jeszcze eksperymentalnej weryfikacji [31,44].

6. UKŁAD UBIKWITYNA/PROTEASOM W AKTYWACJI REAKCJI OBRONNYCH PRZECIW PATOGENOM

Mechanizmy obronne uruchamiane w wyniku swoistych oddziaływań między patogenem a rośliną polegają najogólniej na interakcji pomiędzy roślinnymi białkami kodowanymi przez geny odporności (R) a produktami tzw. genów awirulencji (*Avr*) patogena lub czynnikami, które powstają w wyniku działania tych produktów w roślinie. Spośród licznych białek R (szacuje się, że w *A. thaliana* jest ich około 250) co najmniej

niektóre funkcjonują jako swoiste białka sensorowe rozpoznające zmiany powstałe w wyniku wnikięcia do rośliny określonego białka patogena. W wyniku rozpoznania określonych zmian następuje aktywacja odpowiednich szlaków sygnałowych indukujących różnorodne reakcje obronne [29,54].

Poszukiwania molekularnych mechanizmów reakcji obronnych skierowanych przeciw różnym patogenom przyniosły w ostatnich latach szereg nowych danych, które jednoznacznie wskazują na udział w tych reakcjach układów ubikwitynacji i degradacji białek [8]. W badaniach odporności jęczmienia na zakażenie grzybem *Blumeria graminis f. p. hordei* zidentyfikowano gen *RAR1* (ang. *Required for Mla-dependent Resistance 1*) kodujący cytoplazmatyczne białko z dwiema domenami wiążącymi cynk określanymi akronimem CHORD [8]. Białko RAR1 oddziałuje z różnymi białkami R roślin jedno- i dwuliściennych [47], a także z produktami genów *SGT* (ang. *Suppressor of the G2 allele of skp1-4*) [3]. Białko SGT (w *A. thaliana* SGT1a i SGT1b) oddziałujące poprzez białko SKP1 z ligazami ubikwitynowymi typu SCF jest wspólnym elementem łączącym reakcje obronne przeciw różnym patogenom [2,51,65]. Znaczenie SGT1b w funkcjonowaniu ligazy ubikwitynowej typu SCF potwierdzono także w badaniach ubikwitynacji białek AUX/IAA aktywowanej przez auksynę [18]. Obecnie wiadomo, że kompleks RAR1-SGT1 oddziałuje poprzez podjednostki CSN4 i CSN5 z sygnałosomem COP9 [3,39] oraz z białkiem szoku termicznego HSP90 [27,62]. W proponowanym obecnie modelu zakłada się, że białko R tworzy kompleks z białkami RAR1 i HSP90, a związanie liganda (produktu genu *Avr*) przez białko R bądź wykrycie określonej zmiany powstałej w wyniku zakażenia rośliny, prowadzi do ubikwitynacji i degradacji białek hamujących określone reakcje obronne.

7. INNE PROCESY REGULOWANE W DRODZE SELEKTYWNEJ UBIKWITYNACJI BIAŁEK

Oprócz procesów omówionych w poprzednich rozdziałach, w których rola ubikwitynacji białek została już częściowo poznana, selektywna ubikwitynacja białek reguluje szereg innych reakcji zachodzących w roślinach, których badania dopiero się rozpoczęły. Dobrym przykładem jest tutaj badana obecnie regulacja biosyntezy etylenu, która zachodzi na etapie przemiany S-adenozylu-L-metioniny (AdoMet) do kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (ACC) katalizowanej przez syntazę ACC (ACS). Genom *A. thaliana* zawiera dziewięć genów *ACS* kodujących osiem funkcjonalnych izoform syntazy, których długość życia reguluje ligaza zawierająca białko ETO1 z domeną BTB oddziałująca z kuliną 3 (AtCUL3) [6,69]. Podatność poszczególnych izoform ACS na ubikwitynację regulowana jest w drodze fosforylacji, a aktywność ligazy AtCUL3-ETO1-RBX1, podobnie jak innych ligaz kulinowych, kontrolowana jest poprzez rubinylację/nedylację kulin [6].

W szlaku sygnałowym aktywowanym przez auksynę oprócz ligazy kulinowej SCF funkcjonują także monomeryczne ligazy SINAT5 i XBAT32 z domeną *RING-finger*,

które regulują powstawanie i rozwój korzeni bocznych [45,49]. Ligaza SINAT5 ubikwytynuje czynnik transkrypcyjny NAC1, który reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za tworzenie korzeni bocznych. W giberelinowych szlakach sygnałowych oprócz ligaz SCF^{SLY/SNE} funkcjonuje także ligaza PHOR1 z domeną *U-box* [45], a w kontrolowanym przez gibereliny tworzeniu włosków bierze udział ligaza UPL3 z domeną HECT [14].

W fotoperiodycznej indukcji kwitnienia kluczową rolę gra białko CONSTANS (CO) funkcjonujące jako czynnik transkrypcyjny aktywujący geny konieczne do inicjacji kwitnienia, m.in. gen *FLOWER LOCUST (FT)*. W komórkach rośliny przechowywanej w ciemności białko CO jest ubikwytynowane i ulega proteolizie, natomiast na świetle jego poziom wyraźnie rośnie, chociaż światło o różnej długości fali w różny sposób wpływa na jego stabilizację [68]. Światło dalekiej czerwieni i światło niebieskie stabilizuje poziom CO, podczas gdy światło czerwone sprzyja jego degradacji. W konkluzji można więc stwierdzić, że światło niebieskie i dalekiej czerwieni poprzez układ kryptochromów (Cry1/Cry2) i fitochromu A hamuje ubikwytynację CO, natomiast światło czerwone poprzez fitochrom B promuje ubikwytynację i degradację CO [68].

Ligaza typu SCF z białkiem UFO (ang. *Unusual Floral Organ*) zawierającym kasetę F jest pozytywnym elementem szlaku regulującego ekspresję genów *APETALA3*, które kodują czynniki transkrypcyjne aktywujące geny typu B odpowiedzialne za rozwój pręcików i płatków korony [45], a jak pokazują wyniki najnowszych badań, także za powstawanie innych elementów kwiatu [48].

U mutantów *A. thaliana* o zmienionej liczbie bocznych rozgałęzień pędu oraz u mutantu z opóźnionym starzeniem zidentyfikowano gen *ORE9/MAX2* kodujący białko z kasetą F. Analizując zmiany fenotypowe tych mutantów sugeruje się, że ligaza SCF^{ORE9/MAX2} uczestniczy w ubikwytynacji białek, które regulują powstawanie bocznych rozgałęzień pędu oraz hamują proces starzenia liści [45]. W odpowiedziach rośliny na zmieniające się warunki temperatury uczestniczą ligazy AtCHIP i HOS1 [45]. AtCHIP jest ligazą z domeną *U-box*, natomiast białko HOS1 zawiera domenę *RING-finger*. Mutacje w genie *HLR* (ang. *Halted Root*) kodującym podjednostkę RPT2a proteasomu towarzyszą zaburzenia w rozwoju merystemów wierzchołkowych pędu i korzenia polegające na zmianie kierunku oraz czasu podziałów komórek merystematycznych [66].

Przedstawiony w pracy przegląd aktualnie prowadzonych badań potwierdza, że zależna od ubikwytyny degradacja białek jest kluczowym mechanizmem regulującym różnorodne procesy zachodzące w ciągu całego cyklu życiowego rośliny. W tym miejscu należy także podkreślić, że w dotychczasowych badaniach prowadzonych na roślinach brakuje jak na razie danych na temat mono- i diubikwytynacji, która jak wiadomo nie kieruje białek do proteolizy, lecz gra odmienne role w procesach komórkowych. Można zatem przypuszczać, że w miarę postępu badań liczba poznanych procesów regulowanych w drodze ubikwytynacji białek będzie ciągle wzrastać.

LITERATURA

- [1] ALVEY L, HARBERD NP. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiol Plant* 2005; **123**: 153–160.
- [2] AUSTIN MJ, MUSKETT P, KAHN K, FEYS BJ, JONES JDG, PARKER JE. Regulatory role of *SGT1* in early *R* gene-mediated plant defenses. *Science* 2002; **295**: 2077–2080.
- [3] AZEVEDO C, SADANANDOM A, KITAGAWA K, FREIALDENHOVEN A, SHIRASU K, SCHULZLEFERT P. The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. *Science* 2002; **295**: 2073–2076.
- [4] BEDNARSKA E, LENARTOWSKA M. Mechanizmy samoniezgodności u roślin kwiatowych. *Kosmos* 2003; **52**: 425–443.
- [5] BERLETH T, KROGAN NT, SCARPELLA E. Auxin signals – turning genes on and turning cells around. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 553–563.
- [6] CHAE HS, KIEBER JJ. *Eto Brute?* Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 291–296.
- [7] CLUIS CP, MOUCHEL CF, HARDTKE CS. The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J* 2004; **38**: 332–347.
- [8] DEVOTO A, MUSKETT PR, SHIRASU K. Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 307–311.
- [9] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **435**: 441–445.
- [10] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, WEIJERS D, LECHNER E, YAMADA M, HOBBIE L, EHRISMANN JS, JÜRGENS G, ESTELLE M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 2005; **9**: 109–119.
- [11] DHARMASIRI N, ESTELLE M. Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 302–308.
- [12] DIETERLE M, THOMANN A, RENOU J-P, PARMENTIER Y, COGNAT V, LEMONNIER G, MÜLLER R, SHEN W-H, KRETSCH T, GENSCHIK P. Molecular and functional characterization of *Arabidopsis* Cullin 3A. *Plant J* 2005; **41**: 386–399.
- [13] DORNAN D, WERTZ I, SHIMIZU H, ARNOTT D, FRANTZ GD, DOWD P, ROURKE KO, KOEPPEN H, DIXIT VM. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 2004; **429**: 86–92.
- [14] DOWNES BP, STUPAR RM, GINGERICH DJ, VIERSTRA RD. The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J* 2003; **35**: 729–742.
- [15] ECKARDT NA. MicroRNAs regulate auxin homeostasis and plant development. *Plant Cell* 2005; **17**: 1335–1338.
- [16] FLEET CM, SUN T-P. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 77–85.
- [17] GAGNE JM, SMALLE J, GINGERICH DJ, WALKER JM, YOO S-D, YANAGISAWA S, VIERSTRA RD. *Arabidopsis* EIN-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6803–6808.
- [18] GRAY WM, MUSKETT PR, CHUANG HW, PARKER JE. *Arabidopsis* SGT1b is required for SCF^{TIR1}-mediated auxin response. *Plant Cell* 2003; **15**: 1310–1319.
- [19] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Nagroda Nobla z chemii za 2004 rok – docenienie kontrolowanej, zależnej od ubikwityny, proteolitycznej degradacji białek. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 3–12.
- [20] GUO H, ECKER JR. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 40–49.
- [21] HAN L, MASON M, RISSEEUW EP, CROSBY WL, SOMERS DE. Formation of an SCF^{ZTL} complex is required for proper regulation of circadian timing. *Plant J* 2004; **40**: 291–301.
- [22] HETMANN A, KOWALCZYK S. Szlaki sygnałowe aktywowane przez fitochromy, roślinne receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 155–176.
- [23] HETMANN A, KOWALCZYK S. Roślinne receptory światła niebieskiego i UV-A pośredniczące w reakcjach fototropicznych, fotomorfogenezie i nastawianiu zegara biologicznego. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 441–463.
- [24] HIMMELBACH A, YANG Y, GRILL E. Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 470–479.

- [25] HISCOCK SJ, MCINNIS SM. Pollen recognition and rejection during the sporophytic self – incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 606–613.
- [26] HOECKER U. Regulated proteolysis in light signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 469–476.
- [27] HUBERT DA, TORNERO P, BELKHADIR Y, KRISHNA P, TAKAHASHI A, SHIRASU K, DANGL JL. Cytosolic HSP90 associated with and nodulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *EMBO J* 2003; **22**: 5679–5689.
- [28] IMAIZUMI T, TRAN HG, SWARTZ TE, BRIGGS WR, KAY SA. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 2003; **426**: 302–306.
- [29] INNES RW. Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant Physiol* 2004; **135**: 695–701.
- [30] JANG I-C, YANG J-Y, SEO HS, CHUA N-H. HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev* 2005; **19**: 593–602.
- [31] KAO T-H, TSUKAMOTO T. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 2004; **16**: S72–S83.
- [32] KEMP BP, DOUGHTY J. Just how complex is the *Brassica* S-receptor complex? *J Exp Bot* 2003; **54**: 157–168.
- [33] KEPINSKI S, LEYSER O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005; **17**: 446–451.
- [34] KOWALCZYK S, HADOWSKA E, PIEKARSKA A. Roślinne układy ubikwitynacji i degradacji białek w proteosomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych. *Post Biochem* 2005; **51**: 171–187.
- [35] KOWALCZYK S, HETMANN A. Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Post Biochem* 2003; **49**: 298–318.
- [36] LAUBINGER S, FITTINGHOFF K, HOECKER U. The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 2293–2306.
- [37] LI J. Brassinosteroid signaling: from receptor kinases to transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 526–531.
- [38] LI L, DENG XW. It runs in the family: regulation of brassinosteroid signaling by the BZR1-BES1 class of transcription factor. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 266–268.
- [39] LIU Y, SCHIFF M, SERINO G, DENG X-W, DINESH-KUMAR SP. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Cell* 2002; **14**: 1483–1496.
- [40] LORENZO O, SOLANO R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 532–540.
- [41] MA L, GAO Y, QU L, CHEN Z, LI J, ZHAO H, DENG XW. Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002; **14**: 2383–2398.
- [42] MALLORY AC, BARTEL DP, BARTEL B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* *AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 2005; **17**: 1360–1375.
- [43] MÁŠ P, KIM W-Y, SOMERS DE, KAY SA. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2003; **426**: 567–570.
- [44] MCCLURE B. S-RNase and SLF determine S-haplotype – specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell* 2004; **16**: 2840–2847.
- [45] MOON J, PARRY G, ESTELLE M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* 2004; **16**: 3181–3195.
- [46] MURASE K, SHIBA H, IWANO M, CHE F-S, WATANABE M, ISOGAI A, TAKAYAMA S. A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science* 2004; **303**: 1516–1519.
- [47] MUSKETT PR, KAHN K, AUSTIN MJ, MOISAN LJ, SADANANDOM A, SHIRASU K, JONES JDG, PARKER JE. *Arabidopsis* *RAR1* exerts rate-limiting control of *R* gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* 2002; **14**: 979–992.
- [48] NI W, XIE D, HOBBIE L, FENG B, ZHAO D, AKKARA J, MA H. Regulation of flower development in *Arabidopsis* by SCF complexes. *Plant Physiol* 2004; **134**: 1574–1585.
- [49] NODZON LA, XU W-H, WANG Y, PI L-Y, CHAKRABARTY PK, SONG W-Y. The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J* 2004; **40**: 996–1006.
- [50] PARRY G, ESTELLE M. Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. *Sem Cell Dev Biol* 2004; **15**: 221–229.

- [51] PEART JR, LU R, SADANANDOM A, MOLCUIT I, MOFFETT P, BRICE DC, SCHAUSER L, JAGGARD DAW, XIAO S, COLEMAN MJ, DOW M, JONES JDG, SHIRASU K, BAULCOMBE DC. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**:10865–10869.
- [52] QIAO H, WANG H, ZHAO L, ZHOU J, HUANG J, AHANG Y, XUE Y. The F-box protein AhSLF-S₂ physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* 2004; **16**: 582–595.
- [53] QIAO H, WANG F, ZHAO L, ZHOU J, LAI Z, ZHANG Y, ROBBINS TP, XUE Y. The F-box protein AhSLF-S₂ controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 2004; **16**: 2307–2322.
- [54] SCHULZE-LEFERT P. Plant immunity: The origami of receptor activation. *Curr Biol* 2004; **14**: R22–R24.
- [55] SCHWECHHEIMER C, CALDERÓN VILLALOBOS LIA. Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 677–686.
- [56] SEO HS, WATANABE E, TOKUTOMI S, NAGATAMI A, CHUA N-H. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev* 2004; **18**: 617–622.
- [57] SEO HS, YANG J-Y, ISHIKAWA M, BOLLE C, BALLESTEROS ML, CHUA N-H. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 2003; **423**: 995–999.
- [58] SIJACIC P, WANG X, SKIRPAN AL, WANG Y, DOWD PE, MCCUBBIN AG, HUANG S, KAO TH. Identification of the pollen determinant of SRNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 2004; **429**: 302–305.
- [59] SMALLE J, VIERSTRA RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 555–590.
- [60] STONE SL, ANDERSON EM, MULLEN RT, GORING DR. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* 2003; **15**: 885–898.
- [61] SUBRAMANIAN C, KIM B-H, LYSSENKO NN, XU X, JOHNSON CH, VON ARNIM AG. The *Arabidopsis* repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6798–6802.
- [62] TAKAHASHI A, CASAIS C, ICHIMURA K, SHIRASU K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 11777–11782.
- [63] TAKAYAMA S, ISOGAI A. Molecular mechanism of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *J Exp Botany* 2003; **54**: 149–156.
- [64] THOMANN A, DIETERLE M, GENSCHIK P. Plant CULLIN-based E3s: Phytohormones come first. *FEBS Lett* 2005; **579**: 3239–3245.
- [65] TÖR M, GORDON P, CUZICK A, EULGEM T, SINAPIDOU E, MERK-TÖRK F, CAN C, DANGL JL, HOLUB EB. *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 2002; **14**: 993–1003.
- [66] UEDA M, MATSUI K, ISHIGURO S, SANO R, WADA T, PAPONOV I, PALME K, OKADA K. The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development* 2004; **131**: 2101–2111.
- [67] USHIJIMA K, YAMANE H, WATARI A, KAKEHI E, IKEDA K, HAUCK NR, IEZZONI AF, TAO R. The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J* 2005; **39**: 573–587.
- [68] VALVERDE F, MOURADOV A, SOPPE W, RAVENSCROFT D, SAMACH A, COUPLAND G. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 2004; **303**: 1003–1006.
- [69] WANG KL-C, YOSHIDA H, LURIN C, ECKER JR. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* 2004; **428**: 945–950.
- [70] WANG Z-Y, HE J-X. Brassinosteroid signal transduction – choices of signals and receptors. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 91–96.
- [71] WEBER H, BERNHARDT A, DIETERLE M, HANO P, MUTLU A, ESTELLE M, GENSCHIK P, HELLMANN H. *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol* 2005; **137**: 83–93.
- [72] WEIJERS D, BENKOVA E, JÄGER KE, SCHLERETH A, HAMANN T, KLIENTZ M, WILMOTH JC, REED JW, JÜRGENS G. Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* 2005; **24**: 1874–1885.

- [73] YANAGAWA Y, SULLIVAN JA, KOMATSU S, GUSMAROLI G, SUZUKI G, YIN J, ISHIBASHI T, SAIJO Y, RUBIO V, KIMURA S, WANG J, DENG XW. *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 *in vivo* and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Gen Develop* 2004; **18**: 2172–2181.
- [74] YANG J, LIN R, SULLIVAN J, HOECKER U, LIU B, XU L, DENG XW, WANG H. Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; **17**: 804–821.
- [75] ZIELIŃSKA E, KOWALCZYK S. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 155–183.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 02.11.2005 r.

Przyjęto: 02.02.2006 r.

ul. Konstytucji 3-go Maja 29a/13, 87-100 Toruń

tomasz.hejka@gmail.com

INFORMACJE O NOWYCH KSIĄŻKACH

Ukazał się podręcznik autorstwa Zofii Bielańskiej Osuchowskiej pt. **ZARYS ORGANOGENEZY – Różnicowanie się komórek w narządach**, wydany przez Wydawnictwo Naukowe PWN SA (Warszawa, 2004).

Jest to podręcznik embriologii szczegółowej, przystępnie napisany i bogato ilustrowany. Omówiono w nim zarówno zmiany morfologiczne, jak i molekularne procesu różnicowania się narządów u ptaków i ssaków. W książce zostały opisane:

- nowoczesne metody badań embriologicznych
- mechanizmy gestracji i rozwój narządów pierwotnych
- początkowy rozwój układu nerwowego
- komórki grzebienia nerwowego
- różnicowanie się i rozwój kończyn u ssaków i ptaków
- rozwój układów krwionośnego i limfatycznego
- rozwój przewodu pokarmowego
- gruczoły przewodu pokarmowego
- rozwój układu oddechowego
- jamy ciała i krezki
- narządy wydalnicze
- rozwój narządów płciowych, gruczołów dokrewnych i powłoki zewnętrznej.

Ukazał się również **SŁOWNIK BIOLOGII KOMÓRKI** poświęcony pamięci Profesor Haliny Krzanowskiej, wydany przez Polską Akademię Umiejętności (Kraków 2005).

Autorami słownika jest 37 osób wysoko cenionych w zakresie wiedzy o biologii komórki. Recenzentami słownika byli: prof. dr hab. Maria J. Olszewska oraz prof. dr hab. Szczepan Biliński.

Ukazanie się słownika było możliwe dzięki kompetentnej i ścisłej współpracy autorów i redaktorów, żmudnej pracy redaktorów technicznych: Elżbiety Kołaczkowskiej i Jacka Goduli oraz dużej życzliwości Wydawcy.

OFERTA WYDAWNICZA

Zeszytów naukowych pod nazwą „Postępy Biologii Komórki:

Zeszyty naukowe pn. *Postępy Biologii Komórki* ukazują się od 1974 r. jako kwartalnik.

Głównym wydawcą i dystrybutorem kwartalnika naukowego jest Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – 01-813 Warszawa ul. Marymoncka 99,

tel. (022) 5693830, fax (022) 5693712, e-mail jkawiak@cmkp.edu.pl

W „Postęпах Biologii Komórki” publikowane są artykuły omawiające najnowsze osiągnięcia z zakresu biologii komórki. Zeszyty są przeznaczone dla studentów i nauczycieli, pracowników naukowych uczelni i instytutów naukowych. Wydawanie czasopisma jest możliwe dzięki wsparciu finansowemu Komitetu Edukacji Narodowej..

Zapraszamy wszystkich zainteresowanych problematyką naukowo-badawczą prezentowaną w naszym kwartalniku do korzystania z zamówień zbiorowych i indywidualnych, tzn. z prenumeraty rocznej. Istnieje również możliwość zakupu pojedynczych egzemplarzy, również archiwalnych.

W załączeniu: cennik, warunki zakupu i prenumeraty oraz formularz zamówienia.

Cennik:

WYSZCZEGÓLNIENIE	CENA W PLN
Prenumerata roczna dla jednostek będących osobami prawnymi	150,00
Prenumerata roczna dla osób indywidualnych	50,00
Komplet archiwalny dla jednostek będących osobami prawnymi	100,00
Komplet archiwalny dla osób indywidualnych	30,00
Zakup pojedynczego egz. dla jednostek będących osobami prawnymi	40,00
Zakup pojedynczego egz. dla osób indywidualnych	20,00

Warunki otrzymywania czasopisma

- złożenie zamówienia: faxem, pocztą itp.
- jednoczesne dokonanie wpłaty na konto:

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Warszawie
Nr konta 20 1240 1053 1111 0000 0440 9533

- po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

W sytuacji, kiedy wpłata nastąpi w trakcie trwania prenumeraty, wysyłamy wszystkie zeszyty (numery) czasopisma, które ukazały się w okresie objętym prenumeratą.

tu odciąć

ZAMÓWIENIE

.....dnia.....

nazwa i adres zamawiającego

**Fundacja Biologii Komórki
i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99
01-813 WARSZAWA**

L. Dz.....

Zamawiam/yegz./kmpł„Postępów Biologii Komórki”.

Kwotęzłotych (słownie złotych)

Przekazaliśmy na Wasze konto dnia

Nasz NIP.....

Jednocześnie upoważniamy do wystawienia faktury bez potwierdzającego odbiór podpisu odbiorcy.

(pieczętka imienna i podpis zamawiającego)

KOMUNIKATY

KOMITET ORGANIZACYJNY

XXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów

uprzejmie informuje o organizowanym w dniach 6–9 września 2007 roku w Warszawie XXII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów.

*Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Warzocha
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
XXII Zjazdu PTHiT*

Adres Komitetu:

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa, tel/fax (022) 849-85-07

Zakład Cytologii Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski oraz Oddział Warszawski Towarzystwa Biologii Komórki

zapraszają na organizowany po raz drugi

LETNI KURS HODOWLI KOMÓREK ZWIERZĘCYCH.

Zajęcia odbędą się w dniach od 12 do 14 oraz od 14 do 16 czerwca 2006 roku. Program kursu będzie obejmował zajęcia teoretyczne oraz praktyczne. W ramach zajęć praktycznych Uczestnicy będą mogli zapoznać się z następującymi metodami:

1. Hodowla ustalonych linii komórkowych (hodowle komórek adherentnych i rosnących w zawieszynie).

2. Hodowla mioblastów mysich.

3. Hodowla komórek nowotworowych.

4. Przestrzenna hodowla komórek.

5. Uzyskiwanie zarodkowych komórek macierzystych.

6. Hodowla pierwotna komórek kanalików nerkowych.

Wykłady będą dotyczyły metod prowadzenia hodowli komórkowych, organizacji pracowni, zakładania hodowli pierwotnych, wyprowadzania linii komórkowych, mikroskopii konfokalnej, sposobów analizy i dokumentacji wyników. Dodatkowo odbędzie się prezentacja sprzętu oraz odczynników do hodowli komórek. Zorganizowana zostanie również sesja, na której Uczestnicy będą mogli zaprezentować własne wyniki badań. Szczegółowe informacje dotyczące kursu będą umieszczane na stronie www.biol.uw.edu.pl/cytologia.

Zgłoszenia należy przysyłać (jak najszybciej, najlepiej w porozumieniu z organizatorami) na adres: hodowla@biol.uw.edu.pl lub Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa (formularz zgłoszenia w załączeniu obok).

Formularz zgłoszeniowy**LETNI KURS HODOWLI KOMÓREK ZWIERZĘCYCH**

(imię i nazwisko)

(miejsce pracy)

(adres)

(telefon)

(e-mail)

kurs w dniach 12–14.06.2006

tak

nie

kurs w dniach 14–16.06.2006

tak

nie

zakwaterowanie

tak

nie

abstrakt (opcjonalnie)

ERRATA

do atykułu pt. „**Udział białek stresowych w adaptacji wysiłkowej**” autorstwa Z. Jethona, E. Morawskiej-Ciałowicz, P. Dziegiela, M. Podhorskiej-Okołów opublikowanego w Postęпах Biologii Komórki nr 4 tom 32 z 2005 r.

Strona 702 kończy się:

sarkoplazmatycznych i błonowych [31, 36, 41]. Aktywacja apoptozy miałyby w tym a powinna się kończyć

sarkoplazmatycznych i błonowych [31, 36, 41]. Aktywacja apoptozy miałyby w tym kontekście znaczenie jako mechanizm usuwania „zużytych” lub „zbędnych” białek i umożliwienie w to miejsce syntezy nowych struktur białkowych, bardziej przystoso-

Za zaistniałą pomyłkę serdecznie przepraszamy Czytelników i Autorów.

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.

Cennik dla Autorów w 2006 r.

	odbitek prac			pdf	barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	–	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	100,00	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 2006 pod adresem:
 FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. (022) 5693830, fax. (022) 5693712,
 e-mail: 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 2006
dla instytucji (bibliotek) wynosi	150 zł
dla odbiorców indywidualnych	50 zł

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2006

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
 POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
 tel. (022) 5693830, fax. (022) 5693712, e-mail: 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 przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s.180) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stronę powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA 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 *Physarum 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 zmniejszania 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 niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja rezygnuje 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
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	tak nie
Jest zgodasób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	z komputera IBM	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*

TRZEŚĆ – CONTENT

W tym Zeszyście	1
HENNIG E.E.: Oddziaływania molekularne wybranych czynników wirulencji <i>Helicobacter pylori</i> The molecular interactions of <i>Helicobacter pylori</i> virulence factors	3
MŁYNKOWIAK P., WOJTASZEK P.: Brefeldyna A – wgląd w funkcjonowanie systemu błon komórek roślinnych Brefeldin A – an insight into the functioning of the membrane system of plant cells	19
BRODOWSKA A., LASZCZYŃSKA M., STARCZEWSKI A.: Rola apoptozy w komórkach jajnika – The role of apoptosis in the ovarian cells	35
FILIP A.: Mikro-RNA – małe cząsteczki o wielkim znaczeniu Micro-RNAs – small molecules of big importance	45
LIPSKI K. M., OSTROWSKI K., KOMENDER J., ŚLADOWSKI D.: Udział śródbłonka w formowaniu się naczyń The role of endothelium in vessels formation	59
CHORAŻY-MASSALSKA M., KONTNY E., MAŚLIŃSKI W.: Naturalne komórki regulatorowe (CD4+CD25+) Natural regulatory T cells (CD4+CD25+)	71
KOZIOŁ-LIPIŃSKA J., SIMEONOVA E., MOSTOWSKA A.: Czy mitochondria indukują programowaną śmierć komórki w roślinach? Do mitochondria induce programmed cell death in plants?	81
LIPSKI K.M, OSTROWSKI K., KOMENDER J., ŚLADOWSKI D.: Rola śródbłonka w trakcie rozwoju oraz dojrzewania tkanek i narządów The role of endothelium in development, tissues and organs formation	95
GAJEWSKA A.: Peptydowa modulacja ekspresji genów kodujących podjednostki gonadotropin w przednim płacie przysadki samic szczura Peptidergic modulation of gonadotropin subunit gene expression in the anterior pituitary of female rats.	103
JAKUBISZYN E., DZIĘGIEL P., ZABEL M.: System aktywacji plazminogenu w migracji komórek – The plasminogen activation system in cell migration	123
NOWACZYK K., OBREPALSKA-STEPŁOWSKA A.: Wybrane mechanizmy nabywania odporności organizmów na środki ochrony roślin Chosen mechanisms of acquiring organisms' resistance towards pesticides	137
HEJKA T., KOWALCZYK S.: Zależna od ubikwityny proteoliza białek w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin Ubiquitin-mediated proteolysis of proteins in regulation of plant growth and development	159
Informacja o nowych książkach	175
Oferta wydawnicza	176
Komunikaty	178
Errata	179
Wskazówki dla autorów i warunki prenumeraty	180