

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 33, ISSUE 2/2006  
(181–424)

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 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

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 Ministry of Education and Science.

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 KOROHODA, 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. (022) 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. 20,5. Ark. druk. 15,5. Podpisano do druku i druk ukończono w czerwcu 2006 r.

## W tym Zeszycie

W oku kręgowców występują dwa funkcjonalnie odmienne szlaki odbioru światła. Jeden z nich służy do tworzenia obrazów (pręciki i czopki), a drugi rejestruje zmiany intensywności promieniowania w czasie i uczestniczy w tzw. niewzrokowych odpowiedziach na światło (regulacji rytmów biologicznych, zwięźaniu źrenicy). W tym drugim szlaku uczestniczy melanopsyna, której budowa i funkcje są omawiane w artykule na stronie 229.

W krajach wysoko rozwiniętych rak stercza jest drugą po raku płuca przyczyną zgonu mężczyzn. Badania *in vitro* na liniach komórkowych wyizolowanych z przerzutów raka przyczyniają się do poznania mechanizmu tego procesu. W artykule na stronie 257 omówiono cząsteczki adhezyjne i niektóre antygeny komórek raka prostaty biorące udział w adhezji, co ma znaczenia w powstawaniu przerzutów.

Powstawanie osteoklastów jest procesem tworzenia wielojądrowych komórek zdolnych do resorbowania macierzy kostnej. Komórki te powstają przez fuzję makrofagów regulowaną cytokinami oraz ligandami uwalnianymi lub eksponowanymi przez komórki kościotwórcze. Więcej na ten temat Czytelnik znajdzie na stronie 273.

Metalotioneiny to niskocząsteczkowe białka bogate w reszty cysteinowe, zdolne do wiązania metali ciężkich. Większość metalotionein roślinnych podlega ekspresji tkankowospecyficzej. Więcej na ten temat jest na stronie 285.

Interleukina 15 ma wielokierunkowy wpływ na układ odpornościowy. Cytokina ta stanowi czynnik wzrostu dla limfocytów T CD8<sup>+</sup> pamięci oraz działa na nie antyapoptotycznie. Indukuje powstawanie komórek NK i nasila ich aktywność cytotoksyczną. Więcej na temat tej interleukiny oraz jej znaczenia w procesach chorobowych znajdzie Czytelnik na stronie 303 oraz 327.

Somitogeneza, w czasie której z trzyosiowej mezodermy tworzą się somity, jest podstawą segmentacji ciała u kręgowców. Komórki trzyosiowej mezodermy przechodzą przez trzy fazy różnicowania i dojrzewania. W pierwszej fazie komórki macierzyste przekształcają się w komórki progenitorowe tworzące mezodermę przedsomitową. Potem następuje faza przygotowania do segmentacji oraz segmentacja. W artykule na stronie 393 omówiono mechanizm działania molekularnego oscylacyjnego zegara u zarodków, regulującego somitogenezę.







## MOLEKULARNE MECHANIZMY POWSTAWANIA ZESPOŁU RETTA\*

### MOLECULAR MECHANISMS IN RETT SYNDROME

Dorota JURKIEWICZ<sup>1</sup>, Ewa POPOWSKA<sup>1</sup>, Anna TYLKI-SZYMAŃSKA<sup>2</sup>,  
Małgorzata KRAJEWSKA-WALASEK<sup>1</sup>

Zakład Genetyki Medycznej<sup>1</sup>; Klinika Pediatrii, Oddział Chorób Metabolicznych<sup>2</sup>;  
Instytut “Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

**Streszczenie:** Zespół Retta (RTT) jest chorobą zaburzającą rozwój układu nerwowego, o charakterze dominującym, sprzężoną z chromosomem X. RTT występuje prawie wyłącznie u dziewczynek. U pacjentek z zespołem Retta i jego wariantami fenotypowymi zidentyfikowano mutacje w genie *MECP2*. Gen *MECP2* koduje represor transkrypcji (MeCP2, *methyl-CpG-binding protein 2*), który działa poprzez wiązanie się do zmetylowanego DNA i zagęszczenie struktury chromatyny. Białko MeCP2 ulega szczególnie silnej ekspresji w mózgu. Dotychczas wykryto 370 różnych mutacji w genie *MECP2*. Większość z nich powstaje *de novo* na chromosomie pochodzącym od ojca. W kilkunastu przypadkach udało się stwierdzić korelację pomiędzy genotypem a fenotypem choroby. Jedną z przyczyn zmienności objawów zespołu Retta może być ukierunkowana inaktywacja chromosomu X. Mutacje w genie *MECP2* zostały też zidentyfikowane u kilkunastu chłopców. Badania przeprowadzone na mysich modelach zespołu Retta wykazują, że gen *MECP2* jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego. Białko MeCP2 reguluje ekspresję genów, których produkty biorą udział w tworzeniu nowych połączeń synaptycznych. Ważna rola białka MeCP2 w procesie synaptogenezy tłumaczy specyficzny fenotyp u pacjentów z zespołem Retta.

**Słowa kluczowe:** zespół Retta (RTT), gen *MECP2*, białko MeCP2, mutacje, mysy model zespołu Retta, synapsy.

**Summary:** Rett syndrome (RTT) is an X-linked dominant neurodevelopmental disorder affecting almost exclusively girls. Mutations in the *MECP2* gene have been found in a variety of different RTT phenotypes. The *MECP2* gene encodes a transcriptional repressor (MeCP2, methyl-CpG-binding protein 2) acting by binding to the methylated DNA and producing the compacted chromatin structure. MeCP2 is strongly expressed in brain. Up to now, 370 different *MECP2* mutations have been reported. Most mutations occur *de novo* on the paternal chromosome. In several cases a genotype-phenotype correlation have been found. Skewed XCI patterns may be one of the reasons of the RTT phenotypic heterogeneity. *MECP2* mutations have been also revealed in several male cases. Studies performed on RTT mouse models

\*Praca częściowo przygotowana w ramach projektu KBN nr 3P05E11222.

indicate that *MECP2* gene is required for the proper development and function of the central nervous system. MeCP2 regulates expression of genes encoding proteins which participate in the formation of new synaptic connections. The significant MeCP2 role in the synaptogenesis process explains the Rett patients specific phenotype.

*Key words:* Rett syndrome (RTT), *MECP2* gene, MeCP2 protein, mutations, Rett mouse model, synapses.

## WPROWADZENIE

Zespół Retta (RTT, MIM#312750) jest chorobą zaburzającą rozwój układu nerwowego, występującą prawie wyłącznie u dziewczynek. Zespół ten został po raz pierwszy opisany w 1966 roku [62]. RTT stanowi jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności intelektualnej u kobiet i występuje z częstością od 1/15000 do 1/10000 urodzeń [24]. RTT jest chorobą o charakterze dominującym, sprzężoną z chromosomem X [61].

W klasycznej postaci zespołu Retta pojawianie się objawów zachodzi według określonego schematu. Dziewczynki rodzą się zdrowe i po okresie normalnego rozwoju następuje zahamowanie rozwoju neurologicznego, a nawet regresja zdobytych umiejętności. Przebieg choroby można podzielić na cztery etapy. W pierwszej fazie (6–18 mies.) następuje zatrzymanie prawidłowego rozwoju z pojawieniem się cech autystycznych. W drugim etapie (1–4 lata) dzieci tracą nabyte umiejętności, takie jak mowa i celowe używanie rąk, pojawiają się stereotypowe ruchy rąk, zaburzenia oddychania i zahamowanie przyrostu obwodu głowy. W kolejnym etapie (4–7 lat) następuje pewna stabilizacja, dzieci mogą nauczyć się nawiązywać kontakt z otoczeniem, jednak równocześnie obserwuje się zahamowanie rozwoju somatycznego, wystąpienie skoliozy i napadów padaczki. Czwarty, ostatni etap choroby (5–15 lat lub więcej) przynosi dalsze pogorszenie czynności somatycznych i neurologicznych [60].

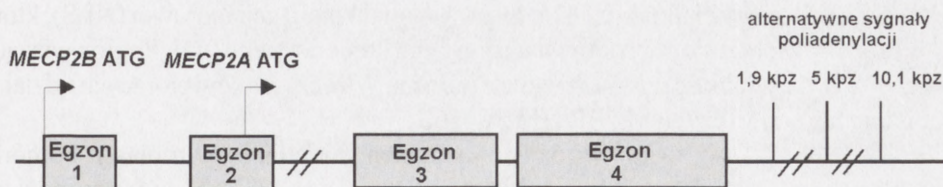
Oprócz klasycznej formy RTT wyróżnianych jest pięć innych wariantów choroby o różnym stopniu nasilenia cech klinicznych. Warianty z lżejszymi objawami to: *forme fruste*, wariant późnej regresji (ang. *late regression variant*) i wariant z zachowaną zdolnością mowy (ang. *preserved speech variant*). Formy z cięższymi objawami fenotypowymi to: forma wrodzona (ang. *congenital form*) i wariant z wczesnodziecięcą padaczką (ang. *early-seizure-onset variant*) [60].

## GEN *MECP2* ODPOWIEDZIALNY ZA RTT

W roku 1998 zlokalizowano locus związany z występowaniem zespołu Retta na długim ramieniu chromosomu X w regionie q28 [68, 77, 78]. Zanalizowano wiele genów z tego obszaru w poszukiwaniu mutacji występujących u pacjentów z zespołem Retta. Ostatecznie w 1999 roku zidentyfikowano mutacje w genie *MECP2* (MIM# 300005) [3].

Gen *MECP2* obejmuje 112,7 kpz (tysięcy par zasad) i składa się z czterech egzonów [59]. Sekwencja genu charakteryzuje się obecnością bardzo długiego intronu 2 (około



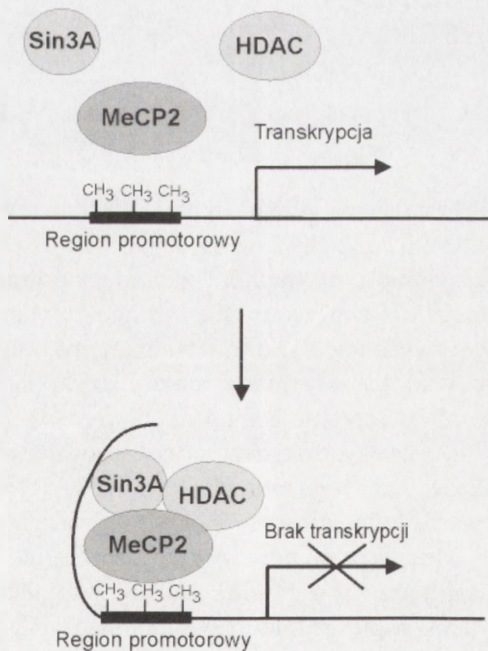


RYCINA 1. Struktura genu *MECP2*. Gen *MECP2* podlega alternatywnemu składaniu tworząc transkrypty *MECP2A* i *MECP2B*. Transkrypt *MECP2A* obejmuje część egzonu 2, egzon 3 i 4, transkrypt *MECP2B* obejmuje egzon 1, 3 i 4

60 kbp) oraz ewolucyjnie konserwatywnego regionu 3'UTR o długości 8,5 kbp [15]. Istnieją dwie izoformy transkryptu: *MECP2A* i *MECP2B*. Izoforma *MECP2A* obejmuje część egzonu 2, egzon 3 i 4, natomiast izoforma *MECP2B* składa się z egzonu 1, 3 i 4, natomiast nie ma 124-nukleotydowego egzonu 2 (ryc. 1) [48]. W wyniku stosowania alternatywnych sygnałów poliadenylacji w regionie 3'UTR powstają transkrypty o różnej wielkości (1,9; 5; 10,1 kbp) [15, 17, 59].

## BUDOWA I FUNKCJA BIAŁKA MeCP2

Gen *MECP2* koduje białko MeCP2 (ang. *methyl-CpG-binding protein 2*) zbudowane z 486 aminokwasów (izoforma MeCP2A) lub z 498 aminokwasów (izoforma MeCP2B) w zależności od użytego alternatywnego miejsca wycinania intronów [37, 48]. Białko MeCP2 składa się z czterech domen: 85-aminokwasowej domeny wiążącej zmetylowane ugrupowania CpG (ang. MBD, *methyl-CpG-binding domain*), 104-aminokwasowej domeny uczestniczącej w represji transkrypcji (ang. TRD, *transcriptional repression domain*), 17-aminokwasowego sygnału lokalizacji jądrowej (ang. NLS, *nuclear localization signal*) leżącego w obrębie domeny TRD oraz regionu wiążącego domenę WW (ang. *WW domain binding region*) złożonego z 162 aminokwasów (ryc. 3) [6, 7, 40, 52, 53,



RYCINA 2. Mechanizm represyjnego działania białka MeCP2 z udziałem korepresora Sin3A i deacetylazy histonowej (HDAC)



55]. Ważną funkcję w białku MeCP2 odgrywa sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), który jest niezbędny w procesie transportu białka do jądra komórkowego [55]. Region wiążący domenę WW ma zdolność do wiązania się z domeną WW czynników biorących udział w wycinaniu intronów (czynniki FBP i HYPC) [6].

Białko MeCP2A występuje w różnych tkankach, takich jak: fibroblasty, komórki limfoblastyczne, wątroba, mięśnie szkieletowe [1, 48, 66, 67]. Najwyższy poziom ekspresji izoformy MeCP2B obserwuje się w mózgu, gdzie jest identyfikowana głównie w neuronach i w mniejszych ilościach w gleju. Ekspresja białka jest związana z procesem tworzenia połączeń synaptycznych [51].

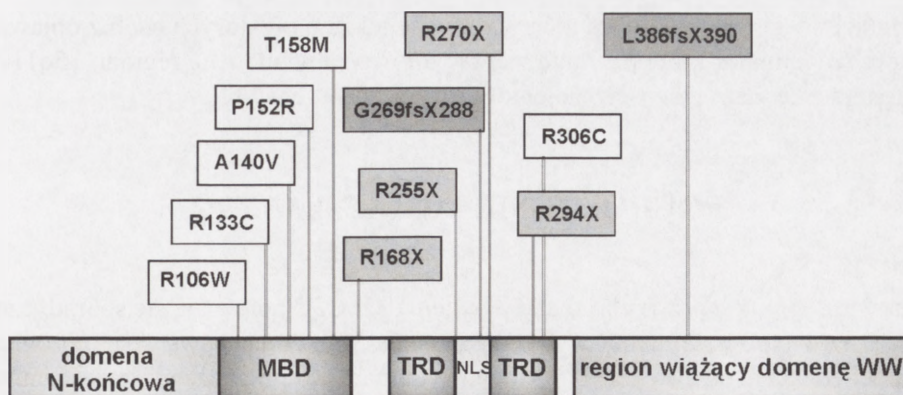
Białko MeCP2 jest represorem transkrypcji, który może działać za pomocą dwóch mechanizmów. Według jednego z nich białko MeCP2 wiąże się za pomocą domeny MBD do zmetylowanego fragmentu DNA w miejscach bogatych w dwunukleotydy CpG. W następnym etapie zachodzi oddziaływanie domeny TRD białka z korepresorem Sin3A i deacetylazą histonową (HDAC) 1 i 2, co prowadzi do deacetylacji histonów H3 i H4 w nukleosomach i zagęszczenia struktury chromatyny, która staje się niedostępna dla kompleksu transkrypcyjnego [31, 54] (ryc. 2). Białko MeCP2 może oddziaływać także z korepresorem c-Ski i N-CoR poprzez domenę TRD i tworzyć z nimi kompleks bez pośrednictwa korepresora Sin3A [36]. Drugi mechanizm działania białka MeCP2 polega na hamowaniu transkrypcji bezpośrednio na poziomie kompleksu preinicjacyjnego poprzez interakcje domeny TRD z czynnikiem transkrypcyjnym IIB (TFIIB) [33].

## MUTACJE W GENIE *MECP2*

Dotychczas zidentyfikowano 370 różnych mutacji w grupie 1700 pacjentów z RTT [<http://mecp2.chw.edu.au>, 47]. Zmiany są rozproszone wzdłuż całego genu i obejmują wszystkie typy mutacji: zaburzące prawidłowe składanie genu (ang. *splice site mutations*), powodujące zmianę informacji kodonu (ang. *missense mutations*), wprowadzające kodon terminacyjny (ang. *nonsense mutations*), delecje i insercje prowadzące do zmiany ramki odczytu (ang. *frameshift mutations*) i duże przegrupowania w regionie genu *MECP2* (ryc. 3).

Mutacje typu *missense* są zlokalizowane głównie w obszarze kodującym domenę MBD. Wiele zmian tego rodzaju, np. R106W, R111G, Y123A, I125A, R133C, F155S, T158M, znacząco zmniejsza powinowactwo białka MeCP2 do zmetylowanego DNA [21].

Mutacje typu *nonsense* są rozproszone wzdłuż całego genu, przy czym większość znajduje się w regionie kodującym fragment białka pomiędzy domenami MBD i TRD oraz w regionie kodującym domenę TRD. Lokalizacja tego typu mutacji sprawia, że powodują one powstanie białka MeCP2 z prawidłową domeną MBD, lecz skróconą domeną TRD lub całkowicie pozbawione tej domeny. Uszkodzone białko nie traci zdolności wiązania się do zmetylowanego DNA, lecz ma zaburzoną funkcję represji transkrypcji [79].



RYCINA 3. Budowa białka MeCP2 i lokalizacja mutacji powtarzalnych. Oznaczenia: MBD – domena wiążąca zmetylowane ugrupowania CpG, TRD – domena represji transkrypcji, NLS – sygnał lokalizacji jądrowej. Białe prostokąty – mutacje *missense*, jasnoszare prostokąty – mutacje *nonsense*, ciemnoszare prostokąty – mutacje *frameshift*

Niewielkie kilkunukleotydowe delecje i insercje występują wzdłuż całego genu [47]. W egzonie 1, kodującym fragment izoformy MeCP2B, zidentyfikowano delecje 5, 8 i 11 par zasad oraz duplikację 5 par zasad [48, 49, 58]. Delecje fragmentów genu o wielkości od kilku do około trzystu nukleotydów są identyfikowane głównie w C-końcowym regionie genu, kodującym powtórzenia polihistydynowe i stanowią około 40% wszystkich wykrywanych mutacji. Delecje w C-terminalnym rejonie powodują utratę końcowych fragmentów białka MeCP2, co prowadzi do utraty zdolności wiązania z domenami WW oraz znacząco zmniejsza trwałość białka [6, 27, 69, 79].

Wykrywane są również duże delecje obejmujące swoim zasięgiem kilka tysięcy par zasad i prowadzące bądź do całkowitej utraty możliwości tworzenia białka lub powstawania białka pozbawionego różnych domen [38, 65].

Mutacjami najczęściej występującymi w genie *MECP2* są substytucje pojedynczego nukleotydu (C>T) w ugrupowaniach CpG, które są prawdopodobnie spowodowane spontaniczną dezaminacją zmetylowanej cytozyny [13]. Mutacje tego typu stanowią około 60% wszystkich opisanych zmian. Najpowszechniej występuje osiem mutacji tego rodzaju: R168X (182 przypadki), T158M (179 przypadków), R255X (159 przypadków), R270X (138 przypadków), R294X (115 przypadków), R306C (92 przypadki), R133C (89 przypadków), R106W (70 przypadków).

W genie *MECP2* zidentyfikowano też około 50 różnych zmian polimorficznych, nieuwważanych za patogenne. Są to jednonukleotydowe podstawienia, które nie powodują zmiany informacji kodonu. Mogą to być również substytucje prowadzące do wstawienia niewłaściwego aminokwasu (np. G428S), które są wykrywane zarówno u chorych, jak i u zdrowych osób, co wskazuje, że zmiany te nie są związane z występowaniem zespołu Retta.



Mutacje w genie *MECP2* są identyfikowane także u niektórych osób z objawami zespołu Angelmana, które nie mają nieprawidłowości w budowie regionu 15q11-13, występujących u większości pacjentów z tym zespołem [42].

## POCHODZENIE MUTACJI *MECP2*

Prawie wszystkie przypadki mutacji w genie *MECP2* pojawiają się sporadycznie. Analiza haplotypów w rodzinie wykazała, że ponad 95% zmian powstaje na chromosomie pochodzącym od ojca [22, 71]. Można to tłumaczyć faktem, że większość mutacji w genie *MECP2* zachodzi w metylowanych ugrupowaniach CpG, a męskie komórki płciowe we wczesnych etapach gametogenezy mają wysoko zmetylowane chromosomy. Dodatkowo w męskiej linii płciowej zachodzi więcej podziałów mitotycznych w porównaniu z żeńską linią płciową [19].

Znane są też przypadki, w których mutacja została odziedziczona od zdrowej lub wykazującej bardzo łagodne objawy matki. Obecność zdrowych nosicielek można tłumaczyć występowaniem mozaikowości germinalnej lub ukierunkowanej inaktywacji chromosomu X, podczas której zostaje inaktywowany głównie zmutowany allel genu. Jednak wyniki badań dotyczące inaktywacji chromosomu X u pacjentów z zespołem Retta nie są jednoznaczne. Niektóre grupy badawcze zidentyfikowały silnie ukierunkowaną inaktywację chromosomu X u zdrowych nosicielek i częściowo ukierunkowaną inaktywację u osób z łagodnymi objawami [5, 26, 74, 80], podczas gdy inna grupa wykazała występowanie losowej inaktywacji u zdrowych nosicielek [46]. Te sprzeczne rezultaty można tłumaczyć zróżnicowanym wzorem X-inaktywacji w różnych tkankach. Istnieje możliwość, że zdrowe nosicielki ze zrównoważoną X-inaktywacją zidentyfikowaną w leukocytach krwi obwodowej prezentują ukierunkowaną inaktywację chromosomu X w mózgu [60].

## KORELACJA POMIĘDZY GENOTYPEM A FENOTYPEM

Badania nad ustaleniem korelacji pomiędzy genotypem a objawami zespołu Retta prowadzą do niespójnych wniosków. Niektóre grupy badawcze nie znalazły znaczącej zależności genotyp-fenotyp [2, 5, 27], podczas gdy inne wykryły taką korelację [8, 16, 26, 50, 69, 80]. Te niezgodności mogą wynikać z różnic w ustalaniu kryteriów oceny ciężkości fenotypu choroby i odmiennej klasyfikacji mutacji w genie *MECP2*. Ponadto różne czynniki modyfikujące, takie jak wzór inaktywacji chromosomu X czy oddziaływanie tła genetycznego, mogą powodować występowanie różnego obrazu klinicznego u pacjentów z taką samą mutacją.

Autorzy prac, w których wykryto korelację genotyp-fenotyp, wykazali, że mutacje powodujące utratę większej części białka (ang. *early truncating mutations*) powodują



wystąpienie cięższych objawów choroby w porównaniu z mutacjami prowadzącymi do utraty tylko małego fragmentu MeCP2 (ang. *late truncating mutations*). Dwa zespoły badawcze dowiodły, że mutacje typu *missense* prowadzą do łagodniejszego fenotypu niż mutacje skracające białko [8, 50]. U pacjentów z klasycznymi objawami RTT zidentyfikowano wszystkie typy mutacji, podczas gdy u pacjentów z zachowaną mową wykryto tylko mutacje typu *missense* i *late truncating*. Powyższe stwierdzenia potwierdzają pogląd, że mutacje powodujące utratę prawie wszystkich funkcji MeCP2 są związane z cięższym fenotypem, natomiast zmiany, które nie znoszą całkowicie funkcji białka, prowadzą do łżejszych objawów. Istnieją również dane wykazujące związek między ciężkim fenotypem a mutacjami uszkodzającymi region genu kodujący sygnał lokalizacji jądrowej [26].

## MUTACJE W GENIE *MECP2* U MĘŻCZYŹN

Zespół Retta jest wykrywany prawie wyłącznie u kobiet, ale opisano również przypadki kilkunastu mężczyzn z wariantami zespołu Retta. Chorych mężczyzn z mutacją zidentyfikowaną w genie *MECP2* można podzielić na trzy grupy. Pacjenci pierwszej grupy mają mutacje niezaprzeczalnie patogenne, typu *nonsense* lub *missense*, które występują również u kobiet z RTT. Wszyscy pacjenci z tej grupy reprezentują rzadko występujące przypadki RTT i charakteryzują się wczesnym wystąpieniem objawów choroby i ciężką encefalopatią. Druga grupa chorych ma mutację w postaci mozaiki pojawiającej się postzygotycznie i w tym przypadku stopień nasilenia objawów zależy od proporcji zmutowanego i zdrowego allele w neuronach. Pacjenci ci mogą prezentować fenotyp RTT lub Retto-podobny. Do tej grupy można też zaliczyć mężczyzn z kariotypem 47, XXY. Trzecia grupa chorych obejmuje pacjentów z mutacjami *missense* odziedziczonymi od matek, które to mutacje nigdy nie są identyfikowane u kobiet z objawami zespołu Retta. U chłopców z tego typu zmianą zawsze występuje niepełnosprawność intelektualna. Szacuje się, że mutacje w genie *MECP2* występują u około 2% mężczyzn z niepełnosprawnością intelektualną [14]. Szczególnie interesującą zmianą wykrywaną u mężczyzn jest mutacja A140V, która jest związana z różnego rodzaju fenotypami, takimi jak: niepełnosprawność intelektualna, niepełnosprawność intelektualna z występowaniem zaburzeń mowy, schizofrenia z utratą mowy i psychoza maniako-depresyjna [11, 14, 35, 39, 57].

## MYSIE MODELE ZESPOŁU RETTA

Białko MeCP2 było początkowo uważane za powszechnie występujący represor transkrypcji, który wiąże się z różnymi zmetylowanymi genami, takimi jak: geny imprintingowe, tkankowo specyficzne i retrowirusowe [18, 20, 41]. Trudno jednak było znaleźć wytłumaczenie, w jaki sposób represor o tak szerokim zakresie działania powoduje objawy ograniczone tylko do zaburzeń układu nerwowego. W celu wyjaśnienia

mechanizmów działania mutacji uszkodzających białko MeCP2 stworzono kilka modeli mysich. Myszy całkowicie pozbawione genu *Mecp2* i myszy z selektywnie usuniętym genem z tkanki mózgowej prezentują kliniczne objawy podobne do objawów zespołu Retta [9, 23]. Mutanty mysie, u których gen *Mecp2* został usunięty z rozwijających się neuronów, oraz mutanty, u których *Mecp2* był usunięty z już zróżnicowanych neuronów, wykazują ten sam fenotyp. Obserwacje te dowodzą, że gen *Mecp2* jest potrzebny dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego i sugerują, że przyczyną wystąpienia objawów RTT nie są zaburzenia we wczesnych, lecz późniejszych etapach rozwoju mózgu.

Badania przeprowadzone na modelu mysim płci męskiej z zachowaną częściowo funkcją *Mecp2* wykazały, że zaburzenia w działaniu *Mecp2* wpływają na acetylację histonów i budowę chromatyny [66].

W innych eksperymentach starano się wyjaśnić, czy inne białka, takie jak MBD1 i MBD2, które wiążą się ze zmetylowanym DNA i wpływają na transkrypcję, mogą częściowo zastępować funkcję białka MeCP2. Uzyskane rezultaty wykazały, że usunięcie genu *Mbd2* z mutantu niemającego genu *Mecp2* nie pogarsza fenotypu myszy, co sugeruje, że białko *Mbd2* nie rekompensuje braku białka *Mecp2* [23].

## MECHANIZMY POWSTAWANIA CHOROBY WPLYW MUTACJI *MECP2* NA SYNAPSY

Większość mutacji w genie *MECP2* powoduje całkowitą lub częściową utratę funkcji białka MeCP2, co wskazuje, że objawy zespołu Retta są spowodowane działaniem mechanizmu niedoboru prawidłowej formy białka [43]. Ostatnio stwierdzono, że także nadmierna ekspresja *MECP2* jest szkodliwa i może prowadzić do niepełnosprawności intelektualnej u mężczyzn [72].

Zaangażowanie białka MeCP2 w represję transkrypcji zależną od metylacji wskazuje, że zespół Retta jest spowodowany zmianami w regulacji ekspresji genów. W wyniku badania profilu ekspresji genów w tkance mózgowej pobranej od zmarłych pacjentów z RTT wykryto zmiany w ekspresji 131 genów [12]. Nadekspresji ulegają geny kodujące białka typowe dla astrogleju, natomiast niższy poziom ekspresji prezentują geny kodujące białka synaptyczne, cytoszkieletalne i dendrytyczne [30]. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami analizy histopatologicznej tkanki mózgowej zmarłych pacjentów z RTT, które wykazały zmniejszoną liczbę synaps i dendrytów [4]. Powyższe badania wskazują, że mutacje w genie *MECP2* zaburzają tworzenie i dojrzewanie synaps.

Obecnie postuluje się, że zespół Retta jest spowodowany zaburzeniami w tworzeniu i utrzymywaniu połączeń synaptycznych. Wadliwe funkcjonowanie białka MeCP2 prowadzi do nieprawidłowości w rozwoju mózgu prawdopodobnie poprzez brak represji transkrypcji genów, które powinny być nieaktywne podczas synaptogenezy. Fenotyp zespołu Retta pojawia się, kiedy silna dysfunkcja białka MeCP2 jest obecna w czasie różnicowania neuronów [28, 34, 64].



Na prawdziwość powyższej hipotezy wskazują ostatnie odkrycia demonstrujące istotną rolę białka MeCP2 w regulacji genów, których produkty są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego.

Wykazano, że białko MeCP2 kontroluje ekspresję czynnika neurotroficznego pochodzącego z mózgu (ang. BDNF, *brain derived neurotrophic factor*). Białko MeCP2 wiąże się do promotora genu *BDNF*, hamując jego transkrypcję w niepobudzonych neuronach. Depolaryzacja błony komórki nerwowej prowadzi do fosforylacji białka MeCP2 w obecności jonów wapnia i jego odłączenia od promotora, co umożliwia transkrypcję *BDNF* [10, 45]. Powyższe odkrycie wskazuje, że białko MeCP2 może regulować transkrypcję genów, których ekspresja zależy od stanu aktywności komórki nerwowej i które odgrywają ważną rolę w tworzeniu i utrzymywaniu połączeń synaptycznych [29, 76].

Ostatnio ukazała się praca, w której opisano powiązanie objawów zespołu Retta z zaburzeniami transkrypcji genu *DLX5* [25]. Badania na myszach wykazały, że brak białka MeCP2 powoduje zwiększenie produkcji białka Dlx5, które odgrywa ważną rolę w syntezie neurotransmitera GABA. Zwiększenie ekspresji genu *Dlx5* przy braku MeCP2 zachodzi w wyniku zmiany trójwymiarowej struktury chromatyny w sąsiedztwie genów *Dlx5* i *Dlx6*. Podejrzewa się, że podobne zaburzenia struktury chromatyny mogą dotyczyć także innych genów, na których ekspresję wpływa MeCP2 [25].

Białko MeCP2 może wpływać także na ekspresję genów indukowanych przez glukokortykoidy *Sgk1* i *Fkbp5* [56]. Brak MeCP2 prowadzi do nadmiernej ekspresji genu *Sgk1*, co powoduje aktywację specyficznych kanałów jonowych i zmiany w pobudliwości neuronów. Nadekspresja genu *Fkbp5*, który koduje receptor glukokortykoidowy, może prowadzić do zaburzeń w szlakach sygnalizacji aktywowanych poprzez hormony steroidowe [43].

Innym genem, na którego aktywność wpływa białko MeCP2, jest gen *UBE3A*, którego mutacje są odpowiedzialne za występowanie zespołu Angelmana, co prawdopodobnie tłumaczy obecność niektórych cech charakterystycznych dla zespołu Angelmana u pacjentów z zespołem Retta [44].

Przeprowadzone badania wskazują, że białko MeCP2, uważane do tej pory za ogólnie działający represor transkrypcji, działa specyficznie w centralnym układzie nerwowym. Białko MeCP2 reguluje ekspresję genów, których produkty występują w komórkach nerwowych i biorą udział w tworzeniu nowych połączeń synaptycznych. Ważna rola białka MeCP2 w procesie synaptogenezy tłumaczy specyficzny fenotyp, związany z występowaniem mutacji w genie *MECP2*, u pacjentów z zespołem Retta [29, 64, 75].

## UDZIAŁ INNYCH GENÓW W PATOGENEZIE ZESPOŁU RETTA

Mutacje w genie *MECP2* są identyfikowane tylko u 70–80% sporadycznych przypadków i u około 50% rodzinnych przypadków klasycznej formy RTT. Brak obecności mutacji w tak dużej grupie pacjentów może być spowodowany trudnymi do wykrycia dużymi delecjami [65] lub mutacjami w niekodujących regionach genu, które



nie są objęte badaniami molekularnymi. Innym możliwym wytłumaczeniem jest występowanie mutacji w innym genie, którego produkt uczestniczy w mechanizmach zależnych od obecności białka MeCP2 lub wpływa na regulację poziomu MeCP2 w mózgu [73].

W nietypowych formach zespołu Retta obserwuje się jeszcze mniejszą wykrywalność mutacji. Większość pacjentów z wariantem zachowanej mowy ma mutacje w genie *MECP2*, ale w przypadkach *forme fruste* i form wrodzonych mutacje występują tylko u 20–40% pacjentów. Jedną z hipotez tłumaczących ten fakt zakłada możliwość częstszego występowania mutacji w regionach regulatorowych *MECP2* u pacjentów z nietypowym RTT w porównaniu z pacjentami prezentującymi klasyczną formę tego zespołu [60].

Ostatnio pojawiły się doniesienia o mutacjach w genie kodującym kinazę zależną od cykliny (*CDKL5*, *STK9*, OMIM#300203). Mutacje w tym genie zidentyfikowano u dwunastu pacjentów z nietypową formą zespołu Retta, związaną z objawami wczesnodziecięcej padaczki [32, 43, 63, 70, 75, 76]. Podobne fenotypowe spektrum mutacji genów *MECP2* i *CDKL5* świadczy o roli obu genów, jaką odgrywają w powszechnym procesie patogenezy. Ekspresja obu genów w różnych strukturach mózgu jest podobna, lecz nie identyczna. Pozostaje do wyjaśnienia wzajemna relacja obu genów, czy oddziałują ze sobą bezpośrednio czy pośrednio i jaką rolę odgrywają w ujawnieniu różnych form zespołu Retta.

## LITERATURA

- [1] AKBARIAN S, CHEN RZ, GRIBNAU J, RASMUSSEN TP, FONG H, JAENISH R, JONES EG. Expression pattern of the Rett syndrome gene *MECP2* in primate prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 2001; **8**: 784–791.
- [2] AMIR RE, VAN DER VEYVER IB, SCHULTZ R, MALICKI DM, TRAN CQ, DAHLE EJ, PHILIPPI A, TIMAR L, PERCY AK, MOTIL KJ, LICHTARGE O, SMITH EO, GLAZE DG, ZOGHBI HY. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 2000; **47**: 670–679.
- [3] AMIR RE, VAN DER VEYVER IB, WAN M, TRAN CQ, FRANCKE U, ZOGHBI HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; **23**: 185–188.
- [4] ARMSTRONG D, DUNN JK, ANTALFFY B, TRIVEDI R. Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; **54**: 195–201.
- [5] BIENVENU T, CARRIE A, DE ROUX N, VINET MC, JONVEAUX P, COUVERT P, VILLARD L, ARZIMANOGLU A, BELDJORD C, FONTES M, TARDIEU M, CHELLY J. *MECP2* mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1377–1384.
- [6] BUSCHDORF JP, STRATLING WH. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med* 2004; **82**: 135–143.
- [7] CHANDLER SP, GUSCHIN D, LANDSBERGER N, WOLFFE AP. The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry* 1999; **38**: 7008–7018.
- [8] CHEADLE JP, GILL H, FLEMING N, MAYNARD J, KERR A, LEONARD H, KRAWCZAK M, COOPER DN, LYNCH S, THOMAS N, HUGHES H, HULTEN M, RAVINE D, SAMPSON JR, CLARKE A. Long-read sequence analysis of the *MECP2* gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1119–1129.

- [9] CHEN RZ, AKBARIAN S, TUDOR M, JAENISCH R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 2001; **27**: 327–331.
- [10] CHEN WG, CHANG Q, LIN Y, MEISSNER A, WEST AE, GRIFFITH EC, JAENISH R, GREENBERG ME. Derepression of BDNF transcription involves calcium dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 2003; **302**: 885–889.
- [11] COHEN D, LAZAR G, COUVERT P, DESPORTES V, LIPPE D, MAZET P, HERON D. MECP2 mutation in a boy with language disorder and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2002; **159**: 148–149.
- [12] COLANTUONI C, JEON OH, HYDER K, CHENCHIK A, KHIMANI AH, NARAYANAN V, HOFFMAN EP, KAUFMANN WE, NAIDU S, PEVSNER J. Gene expression profiling in postmortem Rett syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis* 2001; **8**: 847–865.
- [13] COOPER DN, YOUSOUFIAN H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* 1988; **78**: 151–155.
- [14] COUVERT P, BIENVENU T, AQUAVIVA C, POIRIER K, MORAIN C, GENDROT C, VERLOES A, ANDRES C, LE FEVRE AC, SOUVILLE I, STEFFANN J, DES PORTES V, ROPERS HH, YNTEMA HG, FRYNS JP, BRIAULT S, CHELLY J, CHERIF B. MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 941–946.
- [15] COY JF, SEDLACEK Z, BACHNER D, DELIUS H, POUSTKA A. A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 1253–1262.
- [16] DE BONA C, ZAPPELLA M, HAYEK G, MELONI I, VITELLI F, BRUTTINI M, CUSANO R, LOFFREDO P, LONGO I, RENIERI A. Preserved speech variant is allelic of classic Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**: 325–330.
- [17] D'ESPOSITO M, QUADERI NA, CICCODICOLA A, BRUNI P, ESPOSITO T, D'URSO M, BROWN SD. Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm Genome* 1996; **7**: 533–535.
- [18] DREWELL RA, GODDARD CJ, THOMAS JO, SURANI MA. Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 1139–1144.
- [19] EL-MAARRI O, OLEK A, BALABAN B, MONTAG M, VAN DER VEN H, URMAN B, OLEK K, CAGLAYAN SH, WALTER J, OLDENBURG J. Methylation levels at selected CpG sites in the factor VIII and FGFR3 genes, in mature female and male germ cells: implications for male-driven evolution. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 1001–1008.
- [20] EL-OSTA A, KANTHARIDIS P, ZALCEBERG JR, WOLFFE AP. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 1844–1857.
- [21] FREE A, WAKEFIELD RI, SMITH BO, DRYDEN DT, BARLOW PN, BIRD AP. DNA recognition by the methyl-CpG binding domain of MeCP2. *J Biol Chem* 2001; **276**: 3353–3360.
- [22] GIRARD M, COUVERT P, CARRIE A, TARDIEU M, CHELLY J, BELDJORD C, BIENVENU T. Parental origin of *de novo* MECP2 mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 231–236.
- [23] GUY J, HENDRICH B, HOLMES M, MARTIN JE, BIRD A. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 2001; **27**: 322–326.
- [24] HAGBERG B. Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls. *Acta Paediatr Scand* 1985; **74**: 405–408.
- [25] HORIKE S, CAI S, MIYANO M, CHENG JF, KOHWI-SHIGEMATSU T. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet* 2005; **37**(1): 31–40.
- [26] HUPPKE P, HELD M, HANEFELD F, ENGEL W, LACCONE F. Influence of mutation type and location on phenotype in 123 patients with Rett syndrome. *Neuropediatrics* 2002; **33**: 105–108.
- [27] HUPPKE P, LACCONE F, KRAMER N, ENGEL W, HANEFELD F. Rett syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1369–1375.
- [28] JOHNSTON MW. Clinical disorders of brain plasticity. *Brain Dev* 2004; **26**: 73–80.
- [29] JOHNSTON MV, BLUE ME, NAIDU S. Rett syndrome and neuronal development. *J Child Neurol* 2005; **20**: 759–763.
- [30] JOHNSTON M, JEON O, PEVSNER J, BLUE M, NAIDU S. Neurobiology of Rett syndrome: a genetic disorder of synapse development. *Brain Dev* 2001; [Suppl 1]: S206–S213.
- [31] JONES PL, VEENSTRA GJ, WADE PA, VERMAAK D, KASS SU, LANDSBERGER N, STROUBOULIS J, WOLFFE AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; **19**: 187–191.



- [32] KALSCHEUER VM, TAO J, DONNELLY A, HOLLWAY G, SCHWINGER E, KUBART S, MENZEL C, HOELTZENBEIN M, TOMMERUP N, EYRE H, HARBORD M, HAAN E, SUTHERLAND GR, ROPPERS HH, GECZ J. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasm and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2003; **72**: 1401–1411.
- [33] KALUDOV NK, WOLFFE AP. MeCP2 driven transcriptional repression *in vitro*: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 1921–1928.
- [34] KAUFMANN WE, JOHNSTON MV, BLUE ME. MeCP2 expression and function during brain development: implications for Rett syndrome's pathogenesis and clinical evolution. *Brain Dev* 2005; **27**: S77–S87.
- [35] KLAUCK SM, LINDSAY S, BEYER KS, SPLITT M, BURN J, POUSTKA A. A mutation hot spot for nonspecific X-linked mental retardation in the MECP2 gene causes the PPM-X syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; **70**: 1034–1037.
- [36] KOKURA K, KAUL SC, WADHWA R, NOMURA T, KHAN MM, SHINAGAWA T, YOSUKAWA T, COLMENARES C, ISHII S. The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 2001; **276**: 34115–34121.
- [37] KRIAUCIONIS S, BIRD A. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucl Acid Res* 2004; **32**: 1818–1823.
- [38] LACCONI F, JUNEMANN I, WHATLEY S, MORGAN R, BUTLER R, HUPPKE P, RAVINE D. Large deletions of the MECP2 gene detected by gene dosage analysis in patients with Rett syndrome. *Hum Mut* 2004; **23**: 395.
- [39] LACCONI F, ZOLL B, HUPPKE P, HANEFELG F, PEPINSKI W, TRAPPE R. MECP2 gene nucleotide changes and their pathogenicity in males: proceed with caution. *J Med Genet* 2002; **39**(8): 586–588.
- [40] LASALLE JM, GOLDSTINE J, BALMER D, GRECO CM. Quantitative localization of heterogeneous methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) expression phenotypes in normal and Rett syndrome brain by laser scanning cytometry. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1729–1740.
- [41] LORINCZ MC, SCHUBELER D, GROUDINE M. Methylation-mediated proviral silencing is associated with mecp2 recruitment and localized histone H3 deacetylation. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 7913–7922.
- [42] LOPEZ-RANGEL E, LEWIS MES. Loud and clear evidence for gene silencing by epigenetic mechanisms in autism spectrum and related neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* 2006; **69**: 21–25.
- [43] MARI F, AZIMONTI S, BERTANI I, BOLOGNESE F, COLOMBO E, CASELLI R, SCALA E, LONGO I, GROSSO S, PESCUCCI C, ARIANI F, HAYEK G, BALESTRI P, BERGO A, BADARACCO G, ZAPPELLA M, BROCCOLI V, RENIERI A, KILSTRUP-NIELSEN C, LANDSBERGER N. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 1935–1946.
- [44] MAKEDONSKI K, ABUHATZIRA L, KAUFMAN Y, RAZIN A, SHEMER R. MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 1049–1058.
- [45] MARTINOWICH K, HATTORI D, WU H, FOUSE S, HE F, HU Y, FAN G, SUN YE. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 2003; **302**: 890–893.
- [46] MELONI I, BRUTTINI M, LONGO I, MARI F, RIZZOLIO F, D'ADAMO P, DENVRIENDT K, FRYNS JP, TONIOLO D, RENIERI A. A mutation in the Rett syndrome gene, MECP2, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 982–985.
- [47] MILTENBERGER-MILTENYI G, LACCONI F. Mutations and polymorphisms in the human methyl CpG-binding protein MECP2. *Hum Mutat* 2003; **22**: 107–115.
- [48] MNATZAKANIAN GN, LOHI H, MUNTEANU I, ALFRED SE, YAMADA T, MACLEOD PJ, JONES JR, SCHERER SW, SCHANEN NC, FRIEZ MJ, VINCENT JB, MINASSIAN BA. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet* 2004; **36**(4): 339–341.
- [49] MOIX I, BOTTANI A, RATHGEB JP, HINARD C, MORRIS MA. A second frame-shift mutation confirms the involvement of MECP2 exon 1 in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005; **13** Suppl 1: 279.
- [50] MONROS E, ARMSTRONG J, AIRBAR E, POO P, CANOS I, PINEDA M. Rett syndrome in Spain: mutation analysis and clinical correlations. *Brain Dev* 2001; **23** Suppl 1: S251–S253.
- [51] MULLANEY B, JOHNSTON M, BLUE M. Developmental expression of methyl-CpG binding protein 2 is dynamically regulated in the rodent brain. *Neuroscience* 2004; **123**: 939–949.



- [52] NAN X, CAMPOY FJ, BIRD A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 1997; **88**: 471–481.
- [53] NAN X, MEEHAN RR, BIRD A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 4886–4892.
- [54] NAN X, NG HH, JOHNSON CA, LAHERTY CD, TURNER BM, EISENMAN RN, BIRD A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; **393**: 386–389.
- [55] NAN X, TATE P, LI E, BIRD A. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 414–421.
- [56] NUBER UA, KRIAUCIONIS S, ROLOFF TC, GUY J, SELFRIDGE J, STEINHOFF C, SCHULZ R, LIPKOWITZ B, ROPERS HH, HOLMES MC, BIRD A. Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005 **14**: 2247–2256.
- [57] ORRICO A, LAM C, GALLI L, DOTTI MT, HAYEK G, TONG SF, POON PM, ZAPPELLA M, FEDERICO A, SORRENTINO V. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 2000; **481**: 285–288.
- [58] RAVN K, NIELSEN JB, SCHWARTZ M. Mutations found within exon 1 of MECP2 in Danish patients with Rett syndrome. *Clin Genet* 2005; **67**: 532–533.
- [59] REICHWALD K, THIESEN J, WIEHE T, WEITZEL J, POUSTKA WA, ROSENTHAL A, PLATZER M, STRATLING WH, KIOSCHIS P. Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* 2000; **11**: 182–190.
- [60] RENIERI A, MELONI I, LONGO I, ARIANI F, MARI F, PESCUCCI C, CAMBI F. Rett syndrome: the complex nature of a monogenic disease. *J Mol Med* 2003; **81**: 346–354.
- [61] RETT A. Rett syndrome: history and general overview. *Am J Med Genet* 1986; Suppl 1: 21–25.
- [62] RETT A. Über ein eigenartiges hirnatrophisches syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wochenschr* 1966; **116**: 723–738.
- [63] SCALA E, ARIANI F, MARI F, CASELLI R, PESCUCCI C, LONGO I, MELONI I, GIACHINO D, BRUTTINI M, HAYEK G. CDKL/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 2005; **42**: 103–107.
- [64] SEGAWA M, YOSHIKO N. Rett syndrome. *Curr Opin Neurol* 2005; **18**: 97–104.
- [65] SCHOLLEN E, SMEETS E, DEFLEM E, FRYNS J, MATTHIJS G. Gross rearrangements in the MECP2 gene in three patients with Rett syndrome. Implications for routine diagnosis of Rett syndrome. *Hum Mutat* 2003; **22**: 116–120.
- [66] SHAHBAZIAN M, YOUNG J, YUVA-PAYLOR L, SPENCER C, ANTALFFY B, NOBELS J, ARMSTRONG D, PAYLOR R, ZOGHBI H. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 2002; **35**: 234–254.
- [67] SHAHBAZIAN M, ZOGHBI H. Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 1259–1272.
- [68] SIRIANNI N, NAIDU S, PEREIRA J, PILLOTTO RF, HOFFMAN EP. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 1552–1558.
- [69] SMEETS E, TERHAL P, CASAER P, PETERS A, MIDRO A, SCHOLLEN E, ROOZENDAAL K, MOOG U, MATTHIJS G, HERBERGS J, SMEETS H, CURFS L, CHRANDER-STUMPFL C, FRYNS JP. Rett syndrome in females with CTS hot spot deletions: a disorder profile. *Am J Med Genet* 2005; **132**: 117–120.
- [70] TAO J, VAN ESCH H, HAGEDORN-GREIWE M, HOFFMAN K, MOSER B, RAYNAUD M, SPERNER J, FRYNS JP, SCHWINGER E, GECZ J, ROPERS HH, KALSCHUEUR VM. De novo mutations in the X-linked serine/threonine kinase 9 (STK9) gene are associated with a severe variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: Epub.
- [71] TRAPPE R, LACCONE F, COBILANSCHI J, MEINS M, HUPPKE P, HANEFELD F, ENGEL W. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 1093–1101.
- [72] VAN ESCH H, BAUTERS M, IGNATIUS M, JANSEN M, RAYNAUD M, HOLLANDRES K, LUGTENBERG D, BIENVENU T, JENSEN LR, GECZ J, MORAINÉ C, MARYNEN P, FRYNS JP, FROYEN G. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 2005; **77**: 442–453.

- [73] VILLARD L, LEVY N, XIANG F, KPEBE A, LABELLE V, CHEVILLARD C, ZHANG Z, SCHWARTZ C, TARDIEU M, CHELLY J, ANVRET M, FONTES M. Segregation of a totally skewed pattern of X chromosome inactivation in four familial cases of Rett syndrome without MECP2 mutation: implication for the disease. *J Med Genet* 2001; **38**: 435–442.
- [74] WAN M, LEE SS, ZHANG X, HOUWINK-MANVILLE I, SONG HR, AMIR RE, BUDDEN S, NAIDU S, PEREIRA JL, LO IF, ZOGHBI HY, SCHANEN NC, FRANCKE U. Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 1999; **65**: 1520–1529.
- [75] WEAVING LS, CHRISTODOULOU J, WILLIAMSON SL, FRIEND KL, MCKENZIE OL, ARCHER H, EVANS J, CLARKE A, PELKA GJ, TAM PP, WATSON C, LAHOOTI H, ELLAWAY CJ, BENNETTS B, LEONARD H, GECZ J. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasm and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: Epub.
- [76] WEAVING LS, ELLAWAY CJ, GECZ J, CHRISTODOULOU J. Rett syndrome: clinical review and genetic update. *J Med Genet* 2005; **42**: 1–7.
- [77] WEBB T, CLARKE A, HANEFELD F, PEREIRA JL, ROSENBLUM L, WOODS CG. Linkage analysis in Rett syndrome families suggests that there may be a critical region at Xq28. *J Med Genet* 1998; **35**: 997–1003.
- [78] XIANG F, ZHANG Z, CLARKE A, JOSELUIZ P, SAKKUBAI N, SAROJINI B, DELOZIER-BLANCHET CD, HANSMANN I, EDSTROM L, ANVRET M. Chromosome mapping of Rett syndrome: a likely candidate region on the telomere of Xq. *J Med Genet* 1998; **35**: 297–300.
- [79] YOSUFZAI TM, WOLFFE AP. Functional consequences of Rett syndrome mutations on human MeCP2. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 4172–4179.
- [80] ZAPPELLA M, MELONI I, LONGO I, HAYEK G, RENIERI A. Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. *Am J Med Genet* 2001; **104**: 14–22.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 18.07.2005 r.*

*Przyjęto: 10.02.2006 r.*

*Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa*



# POMPY PROTONOWE PLAZMOLEMY I ICH REGULACJA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

## THE PLASMA MEMBRANE PROTON PUMPS AND THEIR REGULATION IN PLANT CELLS

Ewa MŁODZIŃSKA, Grażyna KŁOBUS

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

*Streszczenie:* Stężenie jonów wodorowych jest wielokrotnie wyższe na zewnątrz komórki niż w jej wnętrzu. Ta różnica utrzymywana jest dzięki obecności w plazmolemie pierwotnych pomp protonowych ( $H^+$ ), które sprzęgają transport protonów z procesem uwalniania energii. Źródłem energii jest hydroliza ATP i dlatego białka te traktowane są jako enzymy mające właściwości ATP-az. Pompa protonowa wykorzystuje ATP jako substrat i wyrzuca  $H^+$  z komórki, a to powoduje ich asymetryczne rozmieszczenie i powstanie gradientu elektrochemicznego, który wykorzystywany jest w wielu procesach fizjologicznych m.in. we wzroście komórek, osmoregulacji i transporcie substancji do wnętrza komórki. W ciągu ostatnich 15 lat poświęcono wiele uwagi zagadnieniom związanym z regulacją potranslacyjną  $H^+$  ATP-az przez różne bodźce egzo- i endogenne o charakterze chemicznym (hormony, NaCl) i fizycznym (temperatura, uszkodzenia mechaniczne). A dynamiczny rozwój badań w dziedzinie biologii molekularnej pozwolił na odkrycie wielu nowych informacji na temat ich genetyki.  $H^+$  ATP-aza jest kodowana przez złożoną rodzinę genów sklasyfikowanych w 5 podrodzinach, z których dwie (I i II) ulegają ekspresji w wielu organach i tkankach, a trzy pozostałe tylko w określonych warunkach, np. w niektórych stadiach rozwoju roślin. Z uwagi na kluczową rolę pomp protonowych w utrzymaniu wielu procesów fizjologicznych w komórce, niezbędna jest ich precyzyjna regulacja na poziomie transkrypcyjnym i posttranslacyjnym, ale mechanizmy tej regulacji nie są do końca poznane. Niniejszy artykuł jest próbą syntezy wiedzy o obu poziomach kontroli i funkcjonowaniu plazmolemowych pomp protonowych w komórkach roślinnych.

*Słowa kluczowe:*  $H^+$  ATP-aza, plazmolema, izoformy, ekspresja genów, regulacja.

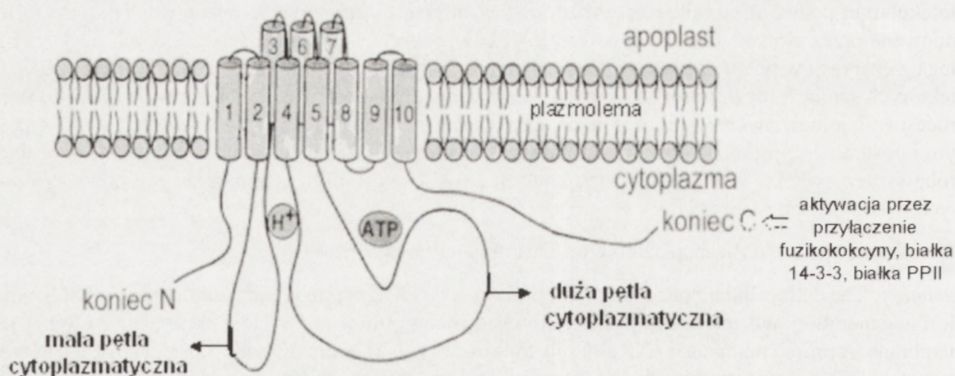
*Summary:* The extracellular concentration of protons is much higher than intracellular its level. Responsible for generation and maintaining this difference is the proton pump ( $H^+$ ) present in the outer cell membrane. A proton pump uses ATP as a substrate and expels  $H^+$  from the cell; consequently, the ions are asymmetrically located and the electrochemical gradient appears, which is used in many physiological processes such as cellular growth, osmoregulation and transport of substances into the cell. During the last 15 years much attention was drawn to the issues related to post-translational regulation of  $H^+$  ATPases by different exogenic and endogenic stimuli of chemical nature (hormones, NaCl) and physical nature (temperature, mechanical damage). A dynamic development of research in the field of molecular biology allowed

to learn much more about their genetics.  $H^+$  ATPase is encoded by a complex family of genes classified into 5 subfamilies, two of which (I and II) are widely expressed in many organs and tissues, whereas remaining three only in specified conditions such as some stages of plant development. Taking into account a key role of proton pumps in maintaining many physiological processes in the cell, their precise regulation at the transcriptional and post-translation levels is indispensable; however, the mechanisms of such regulation are not fully known. This article is an attempt to synthesise the knowledge regarding both levels of control as well as functions of plasmalemma proton pumps in plant cells physiology.

*Key words:*  $H^+$  ATPase, plasma membrane, isoforms, gene expression, regulation.

## WSTĘP

O ile w komórkach zwierząt za utrzymanie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej jest odpowiedzialna  $Na^+ - K^+$  ATP-aza, o tyle w komórkach zarówno roślin, jak i bakterii i grzybów (w tym drożdży) gradient ten jest tworzony zazwyczaj przez  $H^+$  ATP-azę, należącą do rodziny pierwotnych transporterów typu P [57,59]. Wykorzystując energię z hydrolizy trifosforanu adenozy (ATP) pompa protonowa prowadzi do jednokierunkowej translokacji  $H^+$  na zewnątrz komórki. Takie przemieszczenie jonów wodorowych powoduje ich asymetryczne rozmieszczenie i generuje gradient elektrochemiczny, który jest wykorzystywany w komórce w podstawowych procesach fizjologicznych, takich jak: regulacja wewnątrzkomórkowego pH, utrzymanie turgoru i związane z nim procesy (otwieranie aparatów szparkowych, ruchy organów), kiełkowanie (szczególnie w fazie imbibicji), „kwaśny” wzrost komórek oraz transport składników odżywczych w drodze symportu i antyportu [4, 5, 17, 49].  $H^+$  ATP-aza uczestniczy ponadto w adaptacjach do warunków stresowych, pojawiających się podczas całego życia rośliny (zasolenie, uszkodzenia mechaniczne, atak patogenów, wysoka i niska temperatura, stres związany z niedoborem składników mineralnych w środowisku) [35, 40, 52, 65, 72].



RYCINA 1. Struktura plazmolemowej pompy protonowej występującej w komórkach roślinnych (wg Portillo [2000] zmodyfikowane)



Roślinna  $H^+$  ATP-aza jest białkiem monomerycznym o masie cząsteczkowej ok. 100 kDa, którego skład aminokwasowy został określony na podstawie poznanych sekwencji nukleotydowych genów kodujących ten enzym. Stosując badania krystalograficzne ujawniono, że strukturę białka pompy protonowej stanowi łańcuch polipeptydowy, którego 10–12 fragmentów w formie  $\alpha$ -helis przenika przez plazmolemę, a rozbudowana część hydrofilowa z dużą i małą pętlą znajduje się po stronie cytoplazmatycznej [49, 68]. Duża pętla cytoplazmatyczna zawiera miejsce wiązania i hydrolizowania ATP, a mała stanowi miejsce sprzężenia pomiędzy transportem protonów a domeną hydrolityczną. Koniec łańcucha C i N również znajdują się po stronie cytoplazmatycznej (ryc. 1). Terminalny fragment łańcucha stanowi region autoinhibitorowy białka, który poprzez interakcję z regionem katalitycznym, zasłaniając miejsce wiązania ATP i kanał protonowy, prowadzi do inaktywacji pompy protonowej.

Aktywność  $H^+$  ATP-azy jest hamowana przez ortowanadan, który jest inhibitorem kompetencyjnym ATP-az typu P, ponieważ łączy się z ufosforylowaną formą enzymu i blokuje jego aktywność. Podobne działanie inhibitorowe wykazują dietylostilbesterol, dicykloheksylokarbodiimid i erytrozyna B [45].

Z uwagi na udział w podstawowych procesach metabolicznych tego enzymu określanego przez badaczy anglosaskich jako „*master*” podlega on bardzo czulej regulacji na poziomie transkrypcyjnym i posttranslacyjnym. Obydwa poziomy kontroli są obiektem nieustannych badań, które mają przybliżyć mechanizmy działania pomp protonowych w komórkach roślinnych.

## REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PLAZMOLEMOWEJ POMPY PROTONOWEJ

Roślinna  $H^+$  ATP-aza jest kodowana przez złożoną rodzinę genów (rodzina multigenowa). Jakkolwiek funkcje fizjologiczne wielu izoform  $H^+$  ATPazy nie są jeszcze wyjaśnione, to jednak powszechnie uważa się, iż odpowiadają one za utrzymanie prawidłowego, podstawowego metabolizmu komórkowego (ang. *housekeeping enzymes*). Multigenowe rodziny jednostek dziedziczenia z indywidualnymi promotorami umożliwiają różną ekspresję każdej izoformy  $H^+$  ATP-azy w zależności od funkcji, miejsca występowania, stanu fizjologicznego i stadium rozwojowego komórki roślinnej [2, 3]. Różnorodny poziom ekspresji genów kodujących  $H^+$  ATP-azę może być regulowany zarówno przez sygnały środowiska, jak i hormony. Być może więc takie bogactwo genów umożliwi indywidualne dopasowanie enzymu do każdego typu komórki lub/i do funkcji, jakie ma w niej pełnić pompa protonowa. Szczegółowe przeszukiwanie cDNA i bibliotek genomowych pozwoliło na dokładną identyfikację następujących genów plazmolemowej pompy protonowej (tab. 1) Wszystkie zidentyfikowane geny plazmolemowej pompy protonowej zostały sklasyfikowane w 5 podrodzin (I, II, III, IV, V) na podstawie filogenetycznych podobieństw i analiz porównawczych sekwencji nukleotydowych [2]. Geny, których ekspresja zachodzi na wysokim poziomie w wielu

TABELA 1. Tkankowa i organowa ekspresja zidentyfikowanych genów H<sup>+</sup>ATP-azy u wybranych gatunków roślin, numer dostępu wg *National Center for Biotechnology Information* – NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Gen	Numer dostępu NCBI	Lokalizacja produktu białkowego w organach/tkankach	Literatura
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>AHA1</i>	J05570	korzenie/łodygi	[2]
<i>AHA2</i>		korzenie /epiderma	[2] [30]
<i>AHA3</i>		komórki towarzyszące floemu	[2] [16] [30]
<i>AHA4</i>		korzenie/kwiaty	[2]
<i>AHA5</i>			
<i>AHA6</i>			
<i>AHA7</i>			
<i>AHA8</i>			
<i>AHA9</i>	X73676	worki pyłkowe pręcików	[2] [7]
<i>AHA10</i>	S74033	rozwijające się nasiona	[7]
<i>AHA11</i>			
<i>Oryza sativa</i>			
<i>OSA1</i>	D10207		[2]
<i>OSA2</i>	D31843		[2]
<i>OSA3</i>	AF110268		[2]
<i>OSA4</i>	AJ440001		[2]
<i>OSA5</i>	AJ440216		[2]
<i>OSA6</i>	AJ440217		[2]
<i>OSA7</i>	AJ440219		[2]
<i>OSA8</i>	AJ440219		[2]
<i>OSA9</i>	AJ440220		[2]
<i>OSA10</i>	AJ440221		[2]
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>			
<i>PMA1</i>	M80489	korzenie/łodygi/liście/kwiaty/komórki szparkowe	[2] [56]
<i>PMA2</i>	M80492	korzenie/liście/kwiaty/floem/komórki szparkowe	[2] [58]
<i>PMA3</i>	M80490-1	kwiaty /komórki szparkowe	
<i>PMA4</i>	X66737	kwiaty /korzenie/floem/komórki szparkowe	[48] [55]
<i>PMA5</i>		floem	[2]
<i>PMA6</i>		liście/kwiaty /w mechanicznie uszkodzonych tkankach	[53]
<i>PMA7</i>			
<i>PMA8</i>		łodygi /liście	[53]
<i>PMA9</i>		floem	[53]



TABELA 1 cd.

Gen	Nr dostępu NCBI	Lokalizacja produktu białkowego w organach/tkankach	Literatura
<i>Lycopersicon esculentum</i>			
LHA1	M60166	korzenie/łodygi/liście/kwiaty/owoce	[2] [19] [20]
LHA2	AF179442	korzenie/łodygi/liście/kwiaty/owoce/ symbioza z grzybem	[2] [20] [22]
LHA3	U263917	korzenie/łodygi/liście/kwiaty/owoce	[19]
LHA4		[2]	
LHA5		korzenie/liście	[19]
LHA6		korzenie/liście	[19]
LHA7			
LHA8	AF263917	korzenie/liście/ po traktowaniu NaCl	[31]
<i>Vicia faba</i>			
VHA1	U38965	liście/komórki szparkowe, mezofil	[2] [50]
VHA2		liście/komórki szparkowe, mezofil	[2] [50]
VHA3			
VHA4			
VHA5			
<i>Zea mays</i>			
MHA1	U09989	korzenie	[66]
MHA2	X85805	korzenie/łodygi/liście	[66]
MHA3	AJ441084	korzenie/wrażliwe na $\text{NO}_3^-$	[66] [67]
MHA4	AJ539534	korzenie/wrażliwe na $\text{NO}_3^-$	[66] [67]
<i>Cucumis sativus</i>			
CsHA1	AJ703810	korzenie/wrażliwe na niedobór $\text{Fe}^{2+}$	[dane niepublikowane]
CsHA2	AJ703811	korzenie/liście	
	AF289025	korzenie/wrażliwe na odżywianie azotowe	
<i>Solanum tuberosum</i>			
PHA1	X76536	liście/korzenie/bulwy	[29]
PHA2	X76535	liście/korzenie/bulwy	[29]

organach, bez względu na miejsce występowania, stan fizjologiczny i rozwojowy komórki roślinnej, zaliczono do I i II podrodziny. Natomiast geny, których ekspresja jest tkankowo specyficzna, czy też ograniczona do określonego stadium rozwoju bądź indukowana określonymi bodźcami endogennymi (czynniki transkrypcyjne, hormony) lub egzogennymi (stres solny, uszkodzenia mechaniczne) zostały przyporządkowane trzem pozostałym podrodzinom (III, IV, V). Genowa kompozycja (wzór ułożenia intronów) i analiza ekspresji różni się między gatunkami roślin w obrębie tych pięciu podrodziny. Ponadto heterologiczna ekspresja w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* ujawniła,

że różne izoformy należące do jednej podrodziny mają odmienne właściwości biochemiczne i regulatorowe, ale mogą współistnieć w jednym typie komórek. I tak, produkty genów *AHA1*, 2 należące do II podrodziny wykazują różnice w parametrach  $K_m$  i  $V_{max}$ , ale mają zbliżone powinowactwo do ATP i wanadanu, podczas gdy podobne do nich w 88% białko kodowane przez geny *AHA3*, charakteryzuje się niższym powinowactwem do obu tych substancji [2].

Biochemiczna charakterystyka izoform PMA2 i PMA4 (II podrodzina), które ulegają ekspresji w komórkach drożdży, ujawniła znaczne różnice w optimum pH, a także różną wrażliwość na lizofosfatydylocholinę [32]. PMA4 wykazywał wyższą aktywność przy niskim pH. Hipotetyczne wyjaśnienie tego zjawiska opiera się na mniejszej kontroli PMA4 przez domenę autoinhibitorową, niż ma to miejsce dla PMA2, co przyczynia się do wyższej aktywności w wypompowywaniu  $H^+$ . Pojedynczo regulowane enzymy, które wykazują odmienne właściwości kinetyczne, mogą łatwiej przystosować komórki do zmiennych warunków środowiska.

Wysoka ekspresja *PMA1*, 2 i 3, zachodząca tylko w komórkach szparkowych i w kwiatach [48, 58], wydaje się być uwarunkowana wiekiem i czynnikami zewnętrznymi. W komórkach szparkowych *Nicotiana plumbaginifolia* podczas optymalnych warunków wzrostu ekspresja genu *PMA1* jest często niewykrywalna, natomiast gdy młode liście zostaną zanurzone na kilka godzin w wodzie lub w pożywce o bogatym składzie mineralnym, poziom ekspresji tego genu gwałtownie rośnie [45]. Wysoki poziom transkryptu tych trzech izoform w kwiatach można z kolei tłumaczyć specyfiką organu, bowiem w trakcie rozwoju kwiatów wzrasta zapotrzebowanie na metabolity, czerpane przecież z innych tkanek w drodze wtórnego, aktywnego transportu z udziałem  $H^+$  ATP-azy.

Jeden z genów tytoniowych (*PMA6*) charakteryzował się podwyższoną ekspresją w warunkach stresu mechanicznego, sugerując udział tej izoformy w tkankach narażonych na uszkodzenie mechaniczne [55]. Udowodniono także, że ekspresja genów pompy protonowej była wyższa podczas stresu solnego [51]. NaCl indukował wzrost mRNA  $H^+$  ATP-azy zarówno u glikofitów (podczas stresu solnego w korzeniach *Nicotiana plumbaginifolia* aktywowana jest ekspresja genów *PMA2*, *pma4*, *pma5*), jak i u halofitów [51, 58]. U tych ostatnich podwyższony poziom mRNA i synteza *de novo*  $H^+$  ATP-azy może stanowić mechanizm adaptacyjny i decydować o tolerancji tej grupy roślin na zasolenie.

Scharakteryzowano także jedną z izoform plazmolemowych pomp protonowych, która może odgrywać rolę w odpowiedzi pomidorów na stres solny. Obserwowano akumulację transkryptu *LHA8* w liściach i w korzeniach, po ekspozycji roślin na NaCl. Indukcja ta wydawała się być specyficznie wywoływana raczej przez komponent jonowy, a nie stres osmotyczny, ponieważ zastąpienie soli polietylenoglikolem nie wpływało na poziom ekspresji tego genu [31]. Transport  $Na^+$  i  $Cl^-$  przez błony jest zależny od gradientu elektrochemicznego wytworzonego przez pompę protonową. W ten sposób regulacja ekspresji genów kodujących  $H^+$  ATP-azy i kontrola jej aktywności na poziomie białka może stanowić ważny element komórkowy, warunkujący tolerancję na zasolenie. Ta tolerancja wydaje się być związana z gatunkiem roślin, a nawet z indywidualnymi cechami odmianowymi w obrębie tego samego gatunku. Badano dwie odmiany



pszenicy YJ24 i LH20 różniące się między sobą wrażliwością na traktowanie NaCl. Przy 150 mM NaCl zauważono dużo silniejsze zahamowanie wzrostu odmiany YJ24 niż odmiany LH20. W dodatku, w odpowiedzi na działanie soli zanotowano wyższy stopień przepuszczalności błon komórkowych u odmiany YJ24 w porównaniu z LH20. Analiza peroksydacji lipidów w pęcherzykach plazmolemowych wskazywała, że traktowanie chlorkiem sodu powoduje znacznie większe uszkodzenia lipidów w błonach odmiany YJ24 niż u LH20. Z kolei analizy Western-blot ujawniły mniejszą ilość białka H<sup>+</sup>ATP-azy w korzeniach YJ24 eksponowanych przez 72 h na 100 mM NaCl, co mogło być efektem degradacji białka enzymatycznego lub zahamowania jego syntezy. Natomiast wzrost aktywności tego enzymu w korzeniach LH20 mógł być związany ze zmianą w ekspresji genów kodujących ten enzym podczas stresu solnego [77].

Sklonowano również inne geny kodujące plazmolemową pompę protonową u pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) (tab. 1). Analizy Northern-blot wykazały, że transkrypty *LHA1*, *LHA2*, *LHA4* były widoczne we wszystkich badanych organach (korzenie, łodygi, liścienie, liście, zielone i dojrzałe, czerwone owoce), jednak ich ilość różniła się w zależności od rodzaju tkanki. I tak, najwyższy poziom transkrypty *LHA1* znajdowano w dojrzałych owocach, a najniższy w korzeniach. Ekspresja *LHA2* w przeważającej części dotyczyła liścieni i liści i była prawie niewykrywalna w łodygach i korzeniach. W przeciwieństwie do *LHA2*, mRNA *LHA4* był obecny głównie w korzeniach [19, 20]. Natomiast analizy izoform *LHA3*, 5, 6, 7 ujawniły, że izoformy te są bardzo słabo wykrywalne, co hipotetycznie może być związane z regulowaniem ich przez do tej pory niezidentyfikowane czynniki środowiska bądź bodźce endogenne [20]. Interesujące są również wyniki eksperymentów genetycznych dotyczące wpływu światła i cukrów na ekspresję genu *LHA4*. Ilość transkrypty była 2,5-krotnie wyższa w hypokotylach roślin uprawianych w ciemności w porównaniu z roślinami poddanymi optymalnemu oświetleniu. Poza tym akumulacja mRNA *LHA2* i *LHA4* była indukowana po dodaniu do pożywek 100 mM cukrów (glukozy, fruktozy i sacharozy) i ta indukcja wydawała się być uzależniona od pobierania i metabolizmu węglowodanów, ponieważ mannitol i 3-O-metyloglukozę nie zmieniały kumulacji transkrypty tych trzech genów. Można, więc przyjąć, że w aktywacji genów przez światło pośredniczą cukry [46].

Z kolei badania na korzeniach pomidora, żyjących w symbiozie z grzybem *Glomus mosseae*, wykazały, że o aktywności plazmolemowych pomp protonowych decyduje obecność partnera grzybowego. W korzeniach pomidorów zainfekowanych grzybem obserwowano spadek ekspresji genu *LHA1*, natomiast wzrost poziomu mRNA genu *LHA2*. Nie zanotowano natomiast żadnych zmian w poziomie ekspresji genu *LHA4*. Selektywną indukcję *LHA2* można tłumaczyć tym, że białko LHA2 odpowiada prawdopodobnie za generowanie gradientu potencjału elektrochemicznego w błonach przylegających do strzępek grzyba, co jest niezbędne dla aktywnego transportu fosforanów (symport H<sup>+</sup>/fosforan) do symbiotycznej przestrzeni komórek kortykalnych korzeni [22]. Symbioza mikoryzowa zmieniała również wzór ekspresji jednej z izoform genu u *Glomus mosseae* (*GmPMA5*), która osiągała 12-krotnie wyższy poziom w trakcie kontaktu z gospodarzem roślinnym [62]. Analiza białek błonowych metodą Western-blot, z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko H<sup>+</sup>ATP-azie *Arabidopsis*

*thaliana* ujawniła, że w komórkach korzeni żyjących w układzie symbiotycznym ilość tego białka była większa. W dodatku pęcherzyki błonowe izolowane z korzeni mikoryzowych wykazywały wyższą aktywność  $H^+$  ATP-azy wrażliwej na wanadan niż błony pochodzące z roślin niezwiązanych z komponentem grzybowym. Niektórzy autorzy sugerują jednak, że mikoryza może regulować aktywność  $H^+$  ATP-azy także poprzez lepsze sprzężenie transportu protonów z hydrolizą ATP. Obserwowano bowiem, że mikoryza indukowała prawie 2-krotny wzrost w tempie pompowania  $H^+$  bez istotnych zmian w szybkości hydrolizy ATP. Nie wyjaśniono do tej pory mechanizmu tego zjawiska [8].

Zostało również udowodnione, że aktywacja i hamowanie  $H^+$  ATP-azy w kulturach komórkowych pomidora w drodze transkrypcyjnej i potranslacyjnej może być skutkiem reakcji roślin na infekcje przez patogenów czy zranienia [69]. Podobne wyniki otrzymano z doświadczeń na buraku cukrowym, wykazano bowiem, że zmiany aktywności plazmolemowej pompy protonowej zachodzą na poziomie genu i gotowego białkowego produktu w trakcie stresu mechanicznego [52].

Badania molekularne na różnych gatunkach roślin ilustrowały zmiany w poziomach mRNA w zależności od warunków zewnętrznych. Obserwowano zwiększony poziom transkryptów w odpowiedzi na traktowanie auksyną [33, 34, 38], niski potencjał wodny [10] i niskie pH [14]. Dość dokładnie opisano wpływ niskiego zewnątrzkomórkowego pH na wzrost poziomu ekspresji genów u dwóch gatunków glonów *Dunaliella acidifolia* i *D. salina*. W obu przypadkach niskie wartości pH prowadziły do nadekspresji genów kodujących plazmolemowe pompy protonowe, przy czym odpowiedź kwasolubnego glonu *D. acidifolia* wydaje się konstytutywna, natomiast u *D. salina* ma charakter indukcyjny. Wysoki wzrost poziomu ekspresji genu kodującego  $H^+$  ATP-azę u *D. salina* występował po 12 godzinach od przeniesienia tych glonów z pH = 9,0 (warunki kontrolne) do pH = 7,0 [74]. Pompa protonowa w komórkach bakterii kwaśnolubnych *Oenococcus oeni* była również indukowana niskim pH, a jej aktywacja, jak wykazano, mogła odbywać się na poziomie genetycznym, ponieważ komórki bakterii, które rosły przy niskim odczynie (pH = 3,5), miały wyższą zawartość mRNA kodującego plazmolemową  $H^+$  ATP-azę [24]. Jednak podobne badania przeprowadzone na plazmolemowej pompie protonowej z korzeni słonecznika nie ujawniły różnic w aktywności i ilości enzymu podczas zakwaszania czy alkalizacji środowiska zewnętrznego [63].

Także przejściowe spadki temperatur (6–10°C) uruchamiają procesy prowadzące do aktywacji ATP-az. Początkowy wzrost aktywności  $H^+$  ATP-azy w korzeniach ogórka jest odwracalny i stopniowo zmniejsza się w trakcie przedłużania czasu działania niskiej temperatury, co jest skorelowane z obniżoną ekspresją genu kodującego to markerowe białko plazmolemy [1]. W odpowiedzi na niską temperaturę następuje zwiększona ekspresja genów kodujących kinazy zależne od jonów wapnia [43], otwieranie kanałów wapniowych i wzrost stężenia kwasu abscysynowego, a to najprawdopodobniej prowadzi do aktywacji plazmolemowych pomp protonowych.

Wysoką ekspresję genu *NaPHA3* kodującego pompę protonową u *Nepenthes alata* stwierdzono również w warunkach niskiego pH w wyspecjalizowanych organach roślin owadożernych, np. w dzbankach. Z jednej strony niskie pH jest wymagane do aktywacji enzymów proteolitycznych, a z drugiej może aktywować  $H^+$  ATP-azę, która generując gradient elektrochemiczny napędza pobieranie składników odżywczych z trawionych owadów [36].



Modyfikacje aktywności roślinnych pomp plazmolemowych na poziomie transkrypcyjnym mogą być wywoływane także przez dostępność określonych składników mineralnych. Analiza RT-PCR wykazała, że azotany już po trzech godzinach stymulują ekspresję genów *MHA3* i *MHA4* w korzeniach kukurydzy, chociaż odpowiedź była różna w tych obu przypadkach. Ilość transkryptu *MHA3* względem kontroli wewnętrznej (tubuliny) była wyższa o 50–70%, natomiast w przypadku *MHA4* – 120% w porównaniu z kontrolą [66]. Okazało się również, że obecność azotu w pożywce istotnie wpływa na plazmolemową pompę protonową w korzeniach ogórka, a to w jaki sposób zmieniała się jej aktywność, zależało od formy związku azotowego. I tak, obecność azotanów w pożywce wyraźnie stymulowała aktywność hydrolityczną i transporterową pompy, podczas gdy jony amonowe hamowały obie aktywności (dane niepublikowane). Udowodniono, że działanie azotanów i jonów amonowych na aktywność plazmolemowej pompy protonowej obejmowało zarówno poziom genetyczny, jak i różnorakie modyfikacje potranslacyjne. Najnowsze badania [65] dowiodły, że niedobór żelaza może także powodować wzrost transkryptu jednej z izoform *CsHA1* występującej tylko w korzeniach *Cucumis sativus* nawet o 160% w porównaniu z roślinami kontrolnymi, którym podawano Fe. Natomiast druga znaleziona izoforma *CsHA2* nie była wrażliwa na ten mikroelement, a jej obecność wykryto zarówno w korzeniach, jak i liściach ogórka. Należy przy tym zaznaczyć, że obydwie izoformy *CsHA1* i *CsHA2* należą do tej samej II podrodziny.

## POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE PLAZMOLEMOWEJ POMPY PROTONOWEJ

Szereg czynników środowiskowych reguluje katalityczną aktywność roślinnej  $H^+$ ATP-azy na poziomie potranslacyjnym, poprzez modyfikacje struktury białka. Wiadomo, że koniec karboksylowy, tzw. C-koniec jest domeną regulatorową i pełni rolę autoinhibitorową. Odłączenie końca C (trawienie trypsyną), czy zmiany genetyczne (punktowe mutacje i delecje) zmieniające skład aminokwasowy łańcucha oraz inne modyfikacje, takie jak: fosforylacja wybranych reszt aminokwasowych Thr 947, Thr 948 przez specyficzne grupy kinaz (kinazy PKC oraz kinazy białkowe CDPK-zależne od jonów wapnia i kalmoduliny), a także przyłączenie aktywatorów typu fuzikocyna, białko 14-3-3 do C końca pozwalają na przyjęcie przez enzym aktywnej konformacji (ryc. 1). Nie wyjaśniono natomiast jeszcze, jakie funkcje pełniłby koniec z wolną grupą aminokwasową (N-koniec) [25, 42, 56, 57, 61, 71].

Eksperymenty, w których zastosowano proteazy (trypsynę) i usunięto fragment C końca, wykazały, że aktywność enzymu wzrosła [56]. Wykazano także, że mutacje punktowe w regionie fragmentu C aktywują działalność  $H^+$ ATP-azy. Mutacje te powodują identyczny efekt na końcu N enzymu. O tym, że region C pełni funkcje regulatorowe, przekonano się, gdy zbadano kinetykę roślinnego enzymu, którego ekspresja zachodziła w komórkach drożdży. Dowiedziono, że wszystkie mutanty, które

miały skrócony koniec C, wykazywały większą wrażliwość na wanadan i charakteryzowały się wyższą aktywnością enzymatyczną w porównaniu z roślinami kontrolnymi z normalną długością końca węglowego [61].

Jak ujawniono, przynajmniej jedna z reszt serynowych lub treoninowych domeny autoinhibitorowej ulega odwracalnej fosforylacji. Fosforylacja aminokwasów końca C łańcucha polipeptydowego powoduje wzrost aktywności enzymu, więc zasadnicza modyfikacja potranslacyjna plazmolemowej  $H^+$  ATP-azy u roślin i grzybów polega na fosforylacji białka enzymatycznego. Obecnie wiadomo, że fosforylacja białka jest niezbędna dla jego aktywacji. W procesie fosforylacji mogą uczestniczyć kinazy serynowo /treoninowe (należące do kinaz typu PKC) oraz kinazy białkowe (CDPK) zależne od jonów wapnia i kalmoduliny [42,64]. Zastosowanie inhibitorów kinazy białkowej zależnej od  $Ca^{2+}$  powodowało zahamowanie transportu  $H^+$  [15, 27, 75]. Odmienne wyniki uzyskano z badań korzeni buraka czerwonego, w których udowodniono, że zależna od jonów wapnia fosforylacja  $H^+$  ATP-azy hamuje jej aktywność enzymatyczną. Inhibicja ta była odwracalna po traktowaniu alkaliczną fosfatazą [39].

Dodatkowo przyłączenie białka 14-3-3 do ufosforylowanej reszty aminokwasowej na C końcu powodowało przejście enzymu ze stanu niskiej do wysokiej aktywności. Do przyłączenia białka 14-3-3 wymagana jest jedynie fosforylacja pompy protonowej. Po przyłączeniu do ufosforylowanej reszty seryny bądź treoniny białko 14-3-3 powoduje odsunięcie odcinka autoinhibitorowego od domeny katalitycznej [13, 71]. Białka 14-3-3 są klasą białek obecnych we wszystkich organizmach eukariotycznych i funkcjonują jako aktywatory wielu kluczowych enzymów metabolizmu węglowego i azotowego w komórce [13, 41].

Roślina  $H^+$  ATP-aza jest również stymulowana przez toksyny grzybowe m.in. fuzikokcyne, produkowaną przez grzyba *Fusicoccum amygdali*. Toksyna ta prawdopodobnie działa na końcu C aktywując nieaktywny enzym, a nie indukując jego syntezy *de novo*. Fuzikokcyne promuje wiązanie białka 14-3-3 do ufosforylowanego końca węglowego. Najpierw wiąże się z 14-3-3, a potem kompleks ten wiąże się z ufosforylowaną domeną autoinhibitorową, odsłaniając domenę katalityczną i stabilizując aktywną konformację enzymu [53]. Stwierdzono, że roślinny receptor fuzikokcyny należy do rodziny białek 14-3-3. Związany z błoną receptor wiąże fuzikokcyne i kompleks ten aktywuje  $H^+$  ATP-azę. Przypuszcza się, że zmiany metaboliczne wywołane przez fuzikokcyne mogą przebiegać przez swoiste reakcje fosforylacji, angażując kinazy białkowe. Białko 14-3-3 pełni, więc nie tylko funkcję receptora dla fuzikokcyny, ale reguluje również kinazy białkowe specyficzne dla  $H^+$  ATP-azy [54]. Siringomycyna – toksyna z grzyba *Pseudomonas syringae* stymulowała także aktywność plazmolemowej  $H^+$  ATP-azy w pęcherzykach izolowanych z łodyg ryżu, ale ten efekt był niwelowany przez dodanie Brij 58, a to sugerowałoby, że siringomycyna odwraca pęcherzyki i czyni je łatwiej dostępnymi dla ATP [6]. Inna toksyna – betikolina, produkowana przez patogeniczne grzyby *Cerospora beticola* hamuje aktywność  $H^+$  ATP-azy wiążąc jony  $Mg^{2+}$ , a te wymagane są do katalizowania reakcji hydrolizy ATP przez enzym [26].

Najnowsze prace przedstawiają nowo zidentyfikowane na poziomie cDNA i wstępnie scharakteryzowane białko PPI1, które oddziałuje z C końcem  $H^+$  ATP-azy powodując



przejście ze stanu niskiej do wysokiej aktywności. Stymulacja ta ma charakter synergistyczny, bowiem zachodzi również po wcześniejszym traktowaniu białka enzymatycznego fuzikokcyną, a także po usunięciu regionu C, dowodząc, że PPI1 może wchodzić w interakcje także powyżej C-końca [47].

Aktywność  $H^+$ ATP-azy jest również regulowana przez lizofosfolipidy, które są naturalnymi detergentami wytwarzanymi w wyniku działania fosfolipazy i rozkładu fosfolipidów błonowych. Lizofosfolipidy (lizofosfocholina) 2–3-krotnie zwiększają aktywność  $H^+$ ATP-azy. Aktywacja enzymu może wynikać z bezpośredniego oddziaływania lizofosfolipidu na białko i ze zmian konformacyjnych, które prowadzą do odsłonięcia centrum aktywnego. Lizofosfocholina podnosiła stopień hydrolizy ATP i transport  $H^+$ , jednakże wzrost transportu protonów nie wynikał z jej właściwości detergentowych, ponieważ nie zwiększała ona przepuszczalności błony i pasywnego przepływu  $H^+$  [32,57]. Niektórzy badacze uważają, że cholesterol i stigmasterol stymulują aktywność pompy protonowej, podczas gdy inne sterole działają jak inhibitory [45].

Udowodniono, że wiele środowiskowych czynników reguluje aktywność  $H^+$ ATP-azy nie tylko poprzez zmienioną ekspresję genów, ale także w drodze modyfikacji potranslacyjnych. Modulacje te obejmują bezpośrednio zmiany w samej cząsteczce białka  $H^+$ ATP-azy oraz mogą być związane ze zmianami składu frakcji lipidowej błony, co pośrednio również może regulować aktywność enzymu. I tak, światło niebieskie, [18, 79] uszkodzenia tkanek (patogeny) [23, 73, 78, 80], niskie pH [11, 21, 37, 76], zasolenie [9, 35, 70], niedobór żelaza [65] i fosforu [60] oraz obecność kwasów humusowych [12] aktywują  $H^+$ ATPazę poprzez indukcję fosforylacji specyficznych reszt aminokwasowych w obrębie domeny autoinhibitorowej. Dość dokładnie poznano ścieżkę transdukcji sygnału prowadzącą do aktywacji pompy protonowej w warunkach stresu solnego u rzodkiewnika. Badania nad mutantami tych roślin wykazały, że podwyższone stężenie chlorku sodu aktywuje gen *SOS2* kodujący białko wiążące wapń i gen *SOS3* kodujący kinazę białkową. Kompleks *SOS2/SOS3* prawdopodobnie podwyższa aktywność  $H^+$ ATP-azy w drodze fosforylacji, a wytworzona siła protonomotoryczna jest wykorzystywana do napędzania funkcjonującego w plazmolemie antyportera  $Na^+/H^+$  [35, 70].

Wzrost aktywności enzymu poprzez jego zmiany ilościowe może być wywoływany przez auksyny.  $H^+$ ATP-aza jest syntetyzowana w retikulum endoplazmatycznym i stamtąd w wyniku egzocytozy jest wydzielana do cytoplazmy, a auksyny zwiększają sekrecyjny przepływ pęcherzyków z siateczki śródplazmatycznej i ich fuzję z plazmolemą [28].

## PODSUMOWANIE

W wielu roślinach i mikroorganizmach transport protonów zależny od ATP związany jest głównie z regulacją równowagi jonowej i kojarzy się z pompą protonową, której działanie jest podobne do pompy sodowo-potasowej występującej w organizmach zwierzęcych.

Powszechnie wiadomo, że  $H^+$ ATP-azy, z uwagi na istotny udział w podstawowych procesach fizjologicznych podlegają bardzo czulej regulacji, pozwalającej na adaptację

komórek do zmiennych warunków środowiska. Z danych literaturowych wynika, że czynniki, takie jak: zasolenie podłoża, stosunki wodne, warunki świetlne czy hormony roślinne, determinują aktywność enzymu. Niezależnie czy regulacja aktywności enzymu dotyczy poziomu ekspresji genu, czy modyfikacji potranslacyjnych gotowego produktu białkowego musi ona odbywać się bez zakłóceń na wszystkich jej poziomach, aby zapewnić optymalne funkcjonowanie  $H^+$ ATP-azy w komórkach roślinnych.

## LITERATURA

- [1] AHN SJ, IM YJ, CHUNG GC. Sensitivity of plasma membrane  $H^+$ ATPase of cucumber root system in response to low root temperature. *Plant Cell Reports* 2000; **19**: 831–835.
- [2] ARANGO M, GEVAUDANT F, OUFATTOLE M, BOUTRY M. The plasma membrane proton pump ATP-ase: the significance of gene subfamilies. *Planta* 2003; **216**: 355–365.
- [3] AREND M, WEISENSEEL MH, BRUMMER M. Seasonal Changes of Plasma Membrane  $H^+$ ATPase and Endogenous Ion Current during Cambial Growth in Poplar Plants. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1652–1663.
- [4] ARREDONDO CE, SANCHEZ-NIETO S, RENDON-HUERTA E, GONZALEZ-HALPHEN D, GAVILANES-RUIZ M, DIAZ-PONTONES D. The plasma membrane  $H^+$ ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant Sci* 2005; **169**: 11–19.
- [5] ASMAMAN SM, HAUBRICK L. Transport proteins of the plasma membrane. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **8**: 458–467.
- [6] BATOKO H, de KERCHOVE A, d'EXAERDE, BOUTRY M. Modulation of plant plasma membrane  $H^+$ ATPase by phytotoxic lipopeptides produced by the plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae*. *BBA* 1998; **1372**: 216–226.
- [7] BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN MR, BOUTRY M, PALMGREN MG, GRIBSKOV M, HARPER JF, AXELSEN KB. Genomic comparison of P-type ATPase Ion Pumps in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol* 2003; **132**: 618–628.
- [8] BENABDELLAH K, AGUILAR C, FERROL N. Plasma membrane ATP-ase and  $H^+$  transport activities in microsomal membranes from mycorrhizal tomato roots. *J Exp Bot* 1999; **337**: 1349–1349.
- [9] BINZEL ML. NaCl induced accumulation of tonoplast and plasma membrane  $H^+$ ATPase message in tomato. *Plant Physiol* 1995; **94**: 722–728.
- [10] BOYER JS, SUROWY TK. Low water potentials affect expression of genes encoding vegetative storage proteins and plasma membrane proton ATPase in soybean. *Plant Mol Biol* 1991; **16**: 251–262.
- [11] BURGSTALLER W, MULLER B, SCHINNER F. The *in vivo* effect of glucose and extracellular pH on the plasma membrane  $H^+$ ATPase of *Penicillium simplicissimum*. *FEMS Microbiol Let* 1997; **147**: 109–114.
- [12] CANELLAS LP, OLIVARES FL, OKOROKOVA AL. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane  $H^+$ ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiol* 2002; **130**: 1951–1957.
- [13] COMPAROT S, LINGIAH G, MARTIN T. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J Exp Bot* 2003; **54**; **382**: 595–604.
- [14] COSTA MS, de MEIS L. Regulation of plasma membrane  $H^+$ ATPase from corn roots by  $Mg^{2+}$  and pH. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; **1279**: 214–218.
- [15] De NISI MP, DELL'ORTO L, PIROVANO ZOCCHI G. Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma membrane  $H^+$ ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 1999; **209**: 187–194.
- [16] DE WITT N, HONG B, SUSSMAN MR, HARPER JF. Targeting of two *Arabidopsis*  $H^+$ ATPase Isoforms to the Plasma Membrane. *Plant Physiol* 1996; **112**: 833–844.
- [17] DELROT S, ATANASSOVA R, GOMEZ E. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake organic solutes and stress resistance. *Plant Sci* 2001; **161**: 391–404.
- [18] EMI T, KINOSHITA T, SHIMAZAKI K. Specific binding of v14-3-3a Isoform to the plasma Membrane  $H^+$ ATP-ase in response to Blue Light and Fusicoccin in Guard Cells of Broad Bean. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1115–1125.



- [19] EWING NN, BENNETI AB. Assessment of the Number and Expression of P-Type H<sup>+</sup>ATPase Genes in Tomato. *Plant Physiol* 1994; **106**: 547–557.
- [20] EWING NN, WIMMERS LE, MAYER DJ. Molecular Cloning of Tomato Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase. *Plant Physiol* 1990; **94**: 1874–1881.
- [21] FELLE HH. pH Signal and Messenger in Plant Cell. *Plant Biol* 2001; **3**: 577–559.
- [22] FERROL N, JOSE POZO M, ANTEIO M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase gene expression in tomato plants. *J Exp Bot* 2002; **53**: 374: 1683–1687.
- [23] FINNIE CH, ANDERSEN CH, BORCH J. Do 14-3-3 proteins and plasma membrane H<sup>+</sup>ATPases interact in the barley epidermis in response to the barley powdery mildew fungus? *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 137–147.
- [24] FORTIER LCH, TOURDOT-MARECHAL R, DIVIES Ch. Induction of *Oenococcus oeni* H<sup>+</sup>ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol Let* 2003; **222**: 165–169.
- [25] FUGLSANG A, VISCONTI TS, DRUMM K. Binding of 14-3-3 Protein to the Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase AHA2 Involves the Tree C-terminal Residues Tyr 946-Thy-Val and requires Phosphorylation of Thr 947. *J Biol Chem* 1999; **274**; **51**: 36774–36780.
- [26] GOMES E, GORDON-WEEKS R, SIMON-PLAS F. *Cerospora beticola* toxins. Part XVII. The role of the beticolin/Mg<sup>2+</sup> complexes in their biological activity. *BBA* 1996; **1285**: 38–46.
- [27] GOOSSENS A, de la FUENTE N. Regulation of Yeast H<sup>+</sup>ATPase by protein Kinases Belonging to a Family Dedicated to Activation of Plasma Membrane Transporters. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 7654–7661.
- [28] HAGER A, DEBUS G, EDEL H. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane ATPase. *Planta* 1991; **185**: 527–537.
- [29] HARMS K, WOHNER RV, SCHULZ B, FROMMER WB. Isolation and characterization of P-type H<sup>+</sup>ATPase genes from potato. *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 979–988.
- [30] HARPER JF, MANNEY L, DE WITT N, YOO MH, SUSSMAN MR. The *Arabidopsis thaliana* Plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase Multigene. *J Biol Chem* 1990; **265**; **23**: 13601–13608.
- [31] KALAMPANAYIL BD, WIMMERS LE. Identification and characterization of a salt-stress-induced plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase in tomato. *Abstract Plant Cell Environment* 2001; **24**: 99.
- [32] KASANO K, SAKAKIBARA Y. The plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase from higher plants: functional reconstruction into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci* 1995; **111**: 117–131.
- [33] KIM D, KIM YS, JUNG J. Involvement of soluble proteinous factors in auxin-induced modulation of P-type ATPase in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *FEBS Letters* 1997; **409**: 273–276.
- [34] KLEBER N, ALBRECHTOVA JP, FLEIG S. Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase is involved in Auxin-Mediated Cell Elongation during Wheat Embryo Development. *Plant Physiol* 2000; **131**: 1302–1312.
- [35] KŁOBUS G, JANICKA-RUSSAK M. Modulation by cytosolic components of proton pump activities in plasma membrane and tonoplast from *Cucumis sativus* roots during salt stress. *Physiol Plant* 2000; **121**: 84–92.
- [36] KOBAYASHI A, FUKUSAKI E, An Ch-II. Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes Blanco*. *Planta* 2001; **212**: 547–555.
- [37] KURKDJIAN A, GUERN J. Intracellular pH measurement and importance in cell activity. *Ann Rev Plant Physiology, Plant Mol Biol* 1989; **40**: 271–303.
- [38] LAPORTE K, ROSSIGNOL M. Auxin control of the sensitivity the proton translocation catalyzed by the tabacco plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase. *Plant Growth Regulation* 1997; **21**: 19–25.
- [39] LINO B, BAIZABAL-AGUIRRE VM, GONZALES de la VARA LE. The plasma-membrane from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* 1998; **204**: 352–359.
- [40] LURIE S, OTHMAN S, BOROCCHOV A. Effects of heat treatment on plasma membrane of apple fruit. *Postharvest Biology and Biotechnology* 1995; **5**: 29–38.
- [41] Mac KINTOSH C. Regulation of cytosolic enzymes in primary metabolism by reversible protein phosphorylation. *Curr Opin in Plant Biol* 1998, **1**: 224–229.
- [42] MALERBA M, BIANCHETTI R. 14-3-3 Protein-Activated and Autoinhibited Forms of Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase. *Biochem Biophys Research Comm* 2001; **286**: 984–990.
- [43] MARTIN ML, BUSCONI L. A Rice Membrane-Bound Calcium-Dependent protein Kinases Is Activated in Response to Low Temperature. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1442–1449.
- [44] MICHELET B, BOUTRY M. Proton-translocating ATPases of plasma membrane. W: Membranes Specialized Functions in Plants, 1995; rozdz. 16; Bios-Scientific Publishers 1996, Oxford, UK.
- [45] MICHELET B, ŁUKASZEWICZ M, DUPRIEZ V. A Plant Plasma Membrane Proton-ATPase Gene Is Regulated by Development and Environment and Shows Signs of a Translational Regulation. *The Plant Cell* 1994; **6**: 1375–1389.

- [46] MITO N, WIMMERS LE, BENNETT AB. Sugar regulates mRNA Abundance of H<sup>+</sup>ATPase Gene Family Members in Tomato. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1229–1236.
- [47] MORANDINI P, VALERA MC, ALBUMI A. A novel interaction partner for C-terminus of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase (AHA1 isoform): site and mechanism of action on H<sup>+</sup>ATPase activity differ from those of 14-3-3 protein. *The Plant J* 2002; **31**,4: 487–497.
- [48] MORIAU L, BOGAERTS P, BOUTRY M. Identification and characterization of a second plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase gene subfamily in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 1993; **21**: 955–963.
- [49] MORSOMME P, BOUTRY M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase: structure, function and regulation. *BBA Biomembranes* 2000; **1435**: 1–16.
- [50] NAKAJIMA N, SAJI H, AONO M, KONDO N. Isolation of cDNA for a Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase from Guard Cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**,5: 919–924.
- [51] NIU X, NARASIMHAN ML, SALZMAN RA. NaCl regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase gene expression in Glycophyte and Halophyte. *Plant Physiol* 1993; **103**: 712–718.
- [52] NOUBHANI AM, SAKR S, DENIS MH, DELROT S. Transcriptional and post-translational control of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase by mechanical treatments. *BBA* 1996; **1281**: 213–219.
- [53] OECKING C, HAGEMAN K. Association 14-3-3 proteins with C-terminal autoinhibitory domain of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase generates a fusicoccin-binding complex. *Planta* 1999; **207**: 480–482.
- [54] OLIVARI C. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase. IV. Fusicoccin induces the association between the plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase and fusicoccin receptor. *Plant Physiol* 1999; **116**: 529–537.
- [55] OUFATTOLE M, ARANGO M, BOUTRY M. Identification and expression of the tree new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. *Planta* 2000; **210**: 715–722.
- [56] PALMGREN MG. Plant pumps turned on by yeast. *Trends in Plant Sci* 1997; **2**,2: 43–45.
- [57] PALMGREN MG. Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase activity. *Physiol Plant* 1991; **83**: 313–323.
- [58] PEREZ CH, MICHELET B, FERRENT V. Differential expression within a three-gene subfamily encoding plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J Biol Chem* 1992; **267**, 2: 1204–1211.
- [59] PORTILLO F. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1496**: 31–42.
- [60] RAGHOTHAMA KG. Phosphate transport and signaling. *Curr Opin in Biol* 2000; **3**: 182–187.
- [61] REGENBERG B, VILLALBA JM, LANFERMEIJER FC, PALMGREN MG. C-terminal Deletion Analysis of Plant Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase: Yeast as a Model System for Solute Transport across the Plant Plasma Membrane. *The Plant Cell* 1995; **7**: 1655–1666.
- [62] REQUEANA N, BREUNINGER M, FRANKEN P, OCON A. Symbiotic Status, Phosphate and Sucrose Regulate the Expression of two Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1540–1549.
- [63] ROLDAN M, DONAIRE J, PARDO JM. Regulation of root plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase in sunflower seedlings. *Plant Sci* 1991; **79**: 163–172.
- [64] RUTSCHMANN F, STADLER URS. LeCPK1, Calcium-Dependent Protein Kinase from Tomato. Plasma Membrane Targeting and Biochemical Characterization. *Plant Physiol* 2002; **129**: 156–168.
- [65] SANTI S, CESCO S, VARANINI Z, PINTON R. Two plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase gens are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiol Bioch* 2005; **43**,3: 287–292.
- [66] SANTI S, LOCCI G, MONTE R. Induction of nitrate uptake in maize roots: Expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase isoforms. *J Exp Bot* 2003, **54**; **389**: 1851–1864.
- [67] SANTI S, LOCCI G, PINTON R, CESCO S, VARANINI Z. Plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase in Maize roots induced for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1277–1303.
- [68] SCARBOROUGH G. Crystallization, Structure and Dynamics of the Proton-Translocating P-type ATPase. *J Exp Biol* 2000; **203**: 147–154.
- [69] SCHALLER A, OECKING C. Modulation of Plasma-membrane H<sup>+</sup>ATPase Activity Differentially Activates Wound and pathogen Defense in Tomato Plants. *The Plant Cell* 1999; **11**: 263–272.
- [70] SHI H, ISHITANI M, KIM CH, ZHU JK. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *PNAS* 2000; **97**, 6: 6896–6901.



- [71] SVENNELID F, OLSSON A, PIOTROWSKI M. i in. Phosphorylation of Thr-948 at the C Terminus of the Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase Creates a Binding Site for the Regulatory 14-3-3 Protein. *The Plant Cell* 1999; **11**: 2379–2391.
- [72] VITART V, BAXTER DOERNER IP, HARPER JF. Evidence for a role in growth and salt resistance of plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase in root endodermis. *The Plant J* 2000; **27**; **3**: 191–201.
- [73] WANG B, ZHAO H, WANG X. Influence of sound stimulation on Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2002; **25**: 183–188.
- [74] WEISS M, PICK U. Primary Structure and Effect of pH on the Expression of the Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase from *Dunaliella acidophila* i *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 1996; **112**; **4**: 1693–1702.
- [75] XING T, HIGGINS VJ, BLUMWALD E. Regulation of Plant Defense Response to Fungal Pathogens: Two Types of Protein Kinases in the Reversible Phosphorylation of the Host Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase. *The Plant Cell* 1996; **8**: 555–564.
- [76] YAN F, FEEUERLE R, SCHÄFFER S. Adaptation of Active Proton Pumping and Plasmalemma ATPase Activity of Corn Roots to Low Root Medium pH. *Plant Physiol* 1998; **117**: 311–319.
- [77] YANG YI, GUO JK, ZHANG F. NaCl induced changes of the H<sup>+</sup>ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. *Plant Sci* 2004: 913–918.
- [78] YI J, BOCHU W, XIUJUAN W. Influence of sound wave on the microstructure of plasmalemma of chrysanthemum roots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003; **29**: 109–113.
- [79] ZEIGER E. Sensory transduction of blue light in guard cell. *Trend in Plant Sci* 2000; **5**; **5**: 183–184.
- [80] ZHAO HC, ZHU T, WU J, XI BS. Role of protein kinase in the effect of sound stimulation on the PM H<sup>+</sup>ATPase activity of *Chrysanthemum fallus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2002; **26**: 335–340.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 24.11.2005 r.*

*Przyjęto: 22.02.2006 r.*

*ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław*

*e-mail: ewamloda@biol.uni.wroc.pl*





## UDZIAŁ RECEPTORÓW ANGIOTENSYNY AT1, AT2 I AT4 W REGULACJI PROCESÓW POZNAWCZYCH

### PARTICIPATION OF THE ANGIOTENSIN RECEPTORS AT1, AT2 AND AT4 IN REGULATION OF COGNITIVE PROCESSES

Przemysław WIELGAT, Jan Józef BRASZKO

Zakład Farmakologii Klinicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku

**Streszczenie:** Behawioralne, anatomiczne i molekularne badania ostatnich lat przyniosły znaczny postęp w rozumieniu mechanizmów uczenia się i pamięci. Opisano regiony mózgu odpowiedzialne za uczenie się i pamięć, jak również szereg czynników, które mogą modyfikować te procesy. Badania behawioralne wykazały, że poszczególne peptydy angiotensynowe, zwłaszcza angiotensyna II i angiotensyna IV, uczestniczą w procesach uczenia się i pamięci, ale mechanizmy odpowiedzialne za te procesy są niejasne. Badania *in vitro* wykazały, że ważnym ogniwem sygnalizacji za pośrednictwem receptora AT1 jest wzrost aktywności kinaz MAP, prowadzący do aktywacji czynników transkrypcyjnych i syntezy poszczególnych białek. Prokognitywne działanie angiotensyny IV odnotowane w badaniach behawioralnych zostało potwierdzone przez jej związek z niektórymi neurotransmiterami i neuropeptydami uczestniczącymi w procesach pamięci i metabolizmie glukozy. Praca opisuje udział receptorów angiotensynowych w procesach poznawczych.

**Słowa kluczowe:** angiotensyny, receptory angiotensynowe, uczenie się, pamięć, mózg.

**Summary:** Recent behavioural, anatomical and molecular studies brought a considerable progress in understanding mechanisms of learning and memory. Several areas of brain associated with learning and memory as well as plethora of factors that can modify these processes were described. Behavioural studies revealed several angiotensin (Ang) peptides, including Ang II and Ang IV, to participate in learning and memory processes but responsible mechanisms are unclear. *In vitro* studies demonstrated that important parts of signalling from AT1 receptor are increases in activity of MAP kinases, transcriptional factors, and the synthesis of several proteins. Cognitive effects of Ang IV found in behavioural studies were subsequently confirmed by their association with several neurotransmitters and neuropeptides known to be involved in memory formation and glucose metabolism. This review discusses the participation of angiotensin receptors in the cognitive processes.

**Key words:** angiotensins, angiotensin receptors, learning, memory, brain.

## WSTĘP

Zapamiętywanie, przechowywanie i odtwarzanie danych należą do podstawowych procesów psychicznych. Badania układu nerwowego w zakresie procesów poznawczych skupiają się na poszukiwaniu struktur i mechanizmów odpowiedzialnych za uczenie się i pamięć oraz czynników, które te procesy mogą modyfikować. Szeroki zakres tych badań wykracza również poza układ nerwowy obejmując wzajemne oddziaływania z innymi systemami i ich wpływ na czynności umysłowe. Badania anatomiczne wykazały, że konsolidacja różnych typów pamięci zależy od aktywności i sprawności specyficznych regionów mózgu, m.in. hipokampa, jądra migdałowatego, prążkowiec i kory przedczołowej [1]. W obrębie tych struktur opisano neurotransmitery i neuromodulatory zaangażowane w procesy poznawcze, m.in. acetylocholiny, dopaminy, glutaminian, noradrenalinę, serotoninę, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, angiotensynę IV, somatostatynę, substancję P, wazopresynę i oksytocynę. Udział w formowaniu pamięci przypisuje się również insulinie, która reguluje przemiany energetyczne w neuronach i astrocytach oraz syntezę niektórych neuroprzekaźników, głównie dopaminy, serotoniny, kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego i kwasu glutaminowego [68]. Jednym z najlepiej opracowanych na poziomie molekularnym i komórkowym modeli uczenia się i pamięci jest długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP – *long term potentiation*) [52]. Proces ten jest odpowiedzią komórki na kaskadę sygnałów wyzwalaną po pobudzeniu niektórych receptorów postsynaptycznych, np. receptorów glutaminianowych typu NMDA i prowadzi do utrwalenia sieci połączeń pomiędzy neuronami i modyfikacji plastyczności neuronalnej. Kodowanie informacji jest procesem zależnym od czasu i obejmuje 2 fazy: pamięć krótkotrwałą (STM – *short term memory*), która trwa kilka minut i pamięć długotrwałą (LTM – *long term memory*) utrzymującą się kilka dni [35]. Zmiana pamięci krótkotrwałej w długotrwałą wymaga biochemicznych i strukturalnych modyfikacji w obrębie neuronów. Formowanie pamięci krótkotrwałej obejmuje modyfikacje istniejących już białek i połączeń synaptycznych. Zapis danych na czas dłuższy niż kilka minut wymaga bardziej złożonych procesów, bowiem związany jest on ze wzrostem ekspresji genów, syntezą nowych białek i formowaniem nowych synaps [35]. Podstawą tych zmian w biologii komórki są specyficzne mechanizmy sygnalizacyjne opierające się na aktywności kinaz i fosfataz oraz czynników transkrypcyjnych. Badania ostatnich 15 lat z użyciem inhibitorów enzymów wykazały, że kluczowymi ogniwami mechanizmu konsolidacji pamięci są: kinaza białkowa C (PKC – *protein kinase C*), kinaza białkowa A (PKA – *protein kinase A*), kinazy MAP (MAPK – *mitogen activated protein kinase*) i czynniki transkrypcyjne, tj. AP-1 (*activator protein-1*), CREB (*cAMP – response element binding protein*) i STAT (*signal transducers and activators of transcription*) [1, 5]. Przekazywanie sygnału przez kinazy i czynniki transkrypcyjne zwiększa syntezę białek strukturalnych i receptorowych, kanałów jonowych, neuroprzekaźników i neuromodulatorów, reguluje adhezję komórkową z jednoczesnym formowaniem nowych synaps oraz czynność elektryczną i chemiczną neuronów w regionach mózgu związanych z procesami uczenia się i pamięci.



## FUNKCJE UKŁADU RENINA – ANGIOTENSYNA W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM (OUN)

Układ renina – angiotensyna jest kaskadą enzymatyczną, której główny produkt – angiotensyna II reguluje podstawowe funkcje organizmu związane z czynnością systemu sercowo-naczyniowego, podtrzymywaniem ciśnienia krwi, gospodarką wodno-elektrolitową oraz aktywnością seksualną [17, 41]. Angiotensyna II jest prekursorem innych fizjologicznie występujących angiotensyn, takich jak: angiotensyna III, IV, (1-7) i (3-7), które powstają przy udziale aminopeptydazy A i N [63]. Wszystkie angiotensyny są biologicznie czynne i różnią się występowaniem w tkankach i powinowactwem do receptorów. Badania w obrębie mózgu wykazały obecność wszystkich elementów układu renina – angiotensyna oraz receptorów AT1, AT2 i AT4 w OUN [24]. Ośrodkowe działanie angiotensyny II wiąże się z regulacją pragnienia i łaknienia, stymulacją wydzielania hormonów w mózgu, głównie wazopresyny, hormonów adrenokortykotropowego i luteinizującego oraz zwiększania ciśnienia krwi przez pobudzenie neuronów adrenergicznych w polu końcowym rdzenia kręgowego. Obok klasycznych funkcji w OUN, układ renina – angiotensyna bierze udział w procesach uczenia się i pamięci. Liczne badania behawioralne wykazały, że stymulacja receptorów AT1, AT2 i AT4 może ułatwiać uczenie się i konsolidację pamięci [8, 9, 38, 42]. Z tego względu analiza molekularnych podstaw procesów poznawczych zachodzących z udziałem tych receptorów wydaje się w pełni uzasadniona. Również badania z użyciem radioligandów wykazały duże zagęszczenie receptorów angiotensynowych, zwłaszcza AT4, w strukturach mózgu ściśle związanych z pamięcią [14, 3].

Angiotensyna II reguluje podstawowe procesy fizjologiczne przez stymulację receptorów AT1 i AT2. Receptory AT zbudowane są z 3-krotnie glikozyłowanego łańcucha peptydowego złożonego z 359 aminokwasów w receptorze AT1 i 363 aminokwasów w receptorze AT2. Receptor AT przenika 7-krotnie błonę komórkową tworząc po 3 zewnątrz- i 3 wewnątrzkomórkowe pętle. Pierwsza wewnątrzkomórkowa pętla łączy się z białkiem G, które reguluje proces tworzenia sygnału wewnątrzkomórkowego [54]. Mimo zbliżonej długości łańcucha białka receptorowego, receptor AT1 i AT2 u człowieka wykazują jedynie 34% podobieństwo. U gryzoni opisano 2 podtypy receptora AT1: AT<sub>1A</sub> i AT<sub>1B</sub> o wysokiej (94%) homologii [24].

### MECHANIZM PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU OD RECEPTORA AT1 I JEGO UDZIAŁ W PROCESACH POZNAWCZYCH

Większość efektów angiotensyny II w OUN inicjowanych jest przez pobudzenie receptora AT1 zlokalizowanego w neuronach w obrębie podwzgórza i pnia mózgu [27, 64, 4]. Poza tym działanie to obejmuje także stymulację szlaków noradrenergicznych, dopaminergicznych i glutaminianergicznych [56, 69]. Pobudzenie receptora AT1 może

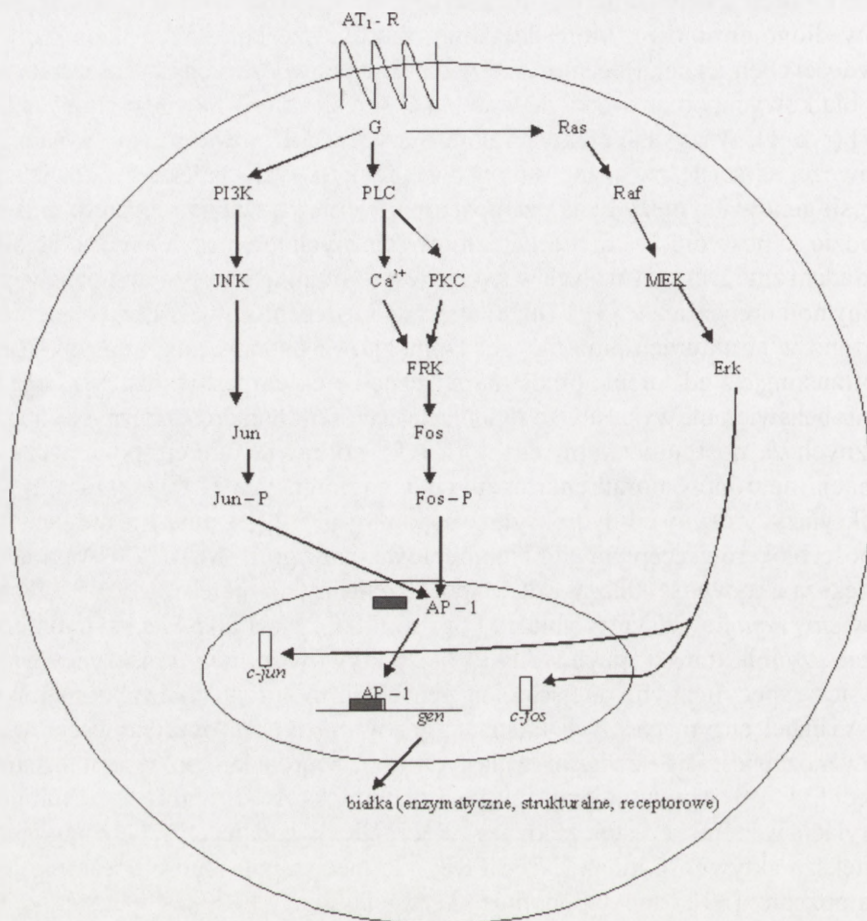
uruchomić co najmniej 5 różnych mechanizmów sygnalizacyjnych, które regulują komórkowe i funkcjonalne efekty angiotensyny II w sercu, nerkach i mięśniówce naczyń. W przekaźnictwie komórkowym uczestniczą fosfolipaza A<sub>2</sub>, fosfolipaza C, fosfolipaza D, cykloaza adenylanowa i kanały wapniowe [17]. Z badań *in vitro* wynika, że mechanizmy przekazywania sygnału od receptora AT1 w neuronach są podobne do tych w tkankach nieneuronalnych i wywołują podobne efekty [57]. Pobudzenie receptora AT1 w mózgu stymuluje wzrost aksonów i dendrytów, adhezję komórek oraz aktywność elektryczną i chemiczną neuronów. Procesy te mogą być kluczowe w procesach poznawczych.

Dobrze poznanym mechanizmem sygnalizacyjnym uruchamianym w wyniku pobudzenia receptora AT1 jest stymulowana przez białko G hydroliza bisfosforanu fosfatydyloinozytolu do trifosforanu inozytolu i diacyloglicerolu przez fosfolipazę C z jednoczesnym uwolnieniem jonów wapniowych Ca<sup>2+</sup> z zasobów wewnątrzkomórkowych i aktywacją kinaz zależnych od wapnia, tj. kinazy białkowej C i zależnej od kalmoduliny kinazy białkowej typu II (CaMKII) [57, 15]. Z kolei fosfolipaza A<sub>2</sub> i fosfolipaza D, aktywowane przez kinazę białkową C, degradowują fosfolipidy komórkowe do arachidonianów i kwasów tłuszczowych [53]. Angiotensyna II wywołuje zarówno krótkotrwałe, jak i długotrwałe zmiany w fizjologii neuronów. Zmiany krótkotrwałe dotyczą regulacji przepływu jonów potasowych i wapniowych przez specyficzne kanały potasowe i wapniowe [58] (ryc. 2). Zmiany aktywności błonowych kanałów jonowych decydują o częstotliwości potencjału czynnościowego i czasie jego trwania [57]. Wykazano, że angiotensyna II wiążąc się z receptorem AT1 stymuluje przepływ jonów wapniowych i hamuje aktywność kanałów potasowych typu A i kanałów potasowych o właściwościach prostujących [58]. Analizy farmakologiczne, biofizyczne i molekularne wykazały, że w indukowanym przez angiotensynę zahamowaniu przepływu jonów uczestniczą bezpośrednio podjednostki kanałów Kv2.2 i Kv1.4 [47, 25]. Powyższe zmiany nie występują po zablokowaniu receptora AT1 przez losartan [59]. Potwierdza to udział receptora AT1 w modulowaniu potencjału czynnościowego w neuronach. Stymulacja lub inhibicja przepływu jonów przez błonę komórkową oraz oddziaływanie na kanały jonowe za pośrednictwem receptorów związanych z białkiem G mogą zachodzić przez bezpośrednie sprzęgnięcie jednostki białka G z kanałem jonowym lub złożony mechanizm enzymatyczny z udziałem kinaz i fosfataz [44]. Analiza wewnątrzkomórkowych mechanizmów uczestniczących w zmianie przepływu jonów potasu i wapnia przez angiotensynę II wskazuje, że jest to proces zależny od jonów wapniowych. Stymulujący wpływ angiotensyny II na przepływ Ca<sup>2+</sup> jest znoszony po zahamowaniu aktywności kinazy białkowej C przez kalfostynę C [59]. Aktywatory PKC, tj. estry forbolu, hamują przepływ jonów przez kanały potasowe typu A [47]. Podobny mechanizm reguluje przepływ jonów przez kanały potasowe o właściwościach prostujących [60]. Dodatkowo wykazano, że ruch tych jonów przez kanały potasowe jest zależny od aktywności CaMKII. Całkowite zahamowanie aktywności CaMKII znosi wpływ angiotensyny II na czynność kanałów potasowych prostujących. Opisane zmiany w przepływie jonów potasowych i wapniowych zwiększają częstotliwość powstawania potencjału czynnościowego, tym samym wzrost aktywności neuronów [57].



Poza modulacją aktywności elektrycznej neuronów, angiotensyna II wywołuje również zmiany długoterminowe, które decydują o strukturze komórek i tkanek oraz ich aktywności chemicznej. Receptor AT1 w tkankach obwodowych zwiększa aktywność kinaz białkowych, co prowadzi do wzrostu ekspresji genów i syntezy nowych białek [67, 7] (ryc. 1). Wszystkie efekty angiotensyny II w OUN, w tym wpływ na procesy poznawcze, są ściśle związane z powstawaniem nowych białek [46]. Zwiększenie ekspresji genów i syntezy białka za pośrednictwem aktywnego receptora AT1 może zachodzić za pośrednictwem mechanizmów zależnych lub niezależnych od białka G. Przykładem zmian długotrwałych w mózgu jest stymulujący wpływ angiotensyny II na neurony noradrenergiczne [51]. Duże zagęszczenie receptorów AT1 w tych neuronach wykazano w strukturach pnia mózgu. Domózgowe podanie angiotensyny II nasila neurotransmisję z udziałem noradrenaliny, czego efektem jest wzrost ciśnienia krwi. Badania behawioralne wykazały, że stymulacja neuronów noradrenergicznych i dopaminergicznych za pośrednictwem receptora AT1 poprawia funkcje poznawcze [51]. Inkubacja neuronów noradrenergicznych z angiotensyną II zwiększa aktywność hydroksylazy tyrozyny i  $\beta$ -hydroksylazy dopaminy [67, 22]. Zmiany te nie zachodzą w obecności blokerów receptora AT1 i inhibitorów kinaz z grupy MAP [23]. Angiotensyna II zwiększa aktywność kinazy Erk w sposób zależny od białek Ras i Raf, ekspresję genów *cfos* i *cjun* oraz syntezę białek Fos i Jun [65, 21]. Białka Fos i Jun dimeryzują tworząc czynnik transkrypcyjny AP-1 [34]. Aktywny czynnik transkrypcyjny AP-1 łączy się ze specyficznymi miejscami na genach promotorowych zwiększając syntezę mRNA i białek enzymatycznych. Ekspresja genów *c-fos* i *c-jun* oraz aktywacja czynnika AP-1 w mózgu jest ściśle związana z plastycznością neuronalną i procesami formowania pamięci [34, 49]. Aby wytworzyć aktywny kompleks AP-1, białka Fos i Jun ulegają fosforylacji, w której uczestniczą kinazy FRK i JNK. W badaniach *in vitro* angiotensyna II zwiększa aktywność kinaz JNK i FRK, ale mechanizm tego procesu nie jest do końca poznany [30]. Prawdopodobnie aktywacja kinazy FRK jest zależna od jonów wapnia, a więc mogą w niej uczestniczyć zależne od wapnia kinazy PKC i CaMKII. Aktywność kinazy JNK nie zależy od jonów wapniowych, a mechanizm fosforylacji tego białka opiera się na oddziaływaniu angiotensyny II na kinazę PI3K [30].

Komunikacja między neuronami, która jest podstawą aktywności umysłowej, inicjuje również ekspresję genów niezbędnych do syntezy specyficznych cząstek warunkujących stabilne połączenia między neuronami [34]. Według Wrighta i wsp. [64] cząsteczki macierzy zewnątrzkomórkowej oraz cząsteczki adhezyjne stabilizują połączenia neuronalne, regulują morfologię komórek i organizację cytoszkieletu, co wpływa na przenoszenie informacji przez błony komórkowe. W oddziaływaniach komórka – komórka i komórka – macierz uczestniczą proteoglikany, glikoproteiny oraz cząsteczki adhezyjne. W rozwijającym się i dojrzałym mózgu występują związane z macierzą glikoproteiny: laminina, tenascyna, witronektyna, trombospondyna, fibronektyna, kolagen typu IV oraz proteoglikany: chondroityno-siarczanowe (agrekan, brewikan, neurokan, fosfakan, wersikan) i heparano-siarczanowe (syndekan-3 i testikan) [63]. W świetle dotychczasowych badań ich rola w mózgu ogranicza się do stabilizacji połączeń neuronalnych, a więc wpływa na plastyczność neuronalną [1, 33]. Składnikami błon komórkowych w



RYCINA 1. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy sygnalizacyjne w odpowiedzi na stymulację receptora AT<sub>1</sub> (omówienie procesu i objaśnienie skrótów w tekście)

mózgu są liczne cząsteczki adhezyjne, m.in. integryny, kadheryny, selektyny i neuronalne cząsteczki adhezji komórkowej (NCAM – *neural cell adhesion molecules*) [35, 60, 37, 39]. Badania *in vitro* na neuronach hipokampu wykazały, że cząsteczki adhezyjne uczestniczą w powstawaniu i podtrzymywaniu LTP [53]. Inkubacja tych neuronów z przeciwciałami przeciwko integrynom i kadherynom uniemożliwia LTP [61].

Dotychczasowe badania nie wykazały bezpośredniego wpływu angiotensyny II na syntezę glikokoniugatów w mózgu, ale takiej możliwości nie można wykluczyć. Stymulacja receptora AT<sub>1</sub> zwiększa znamienne syntezę *de novo* proteoglikanów w komórkach mięśniowych naczyń krwionośnych. Figueroe i wsp. wykazali, że angiotensyna II w stężeniu 1 μM zwiększa inkorporację [<sup>3</sup>H]glukozaaminy do łańcucha glikoaminoglikanowego [20]. Losartan w stężeniu 2 μM całkowicie hamuje stymulowaną przez angiotensynę syntezę proteoglikanów, co sugeruje udział receptora AT<sub>1</sub>



w tym procesie. Zwiększenie syntezy proteoglikanów przez angiotensynę II wiąże się z jej udziałem w przemodelowaniu tkanek i przebudowie cytoszkieletu [20]. W obrębie tkanek nieneuronalnych zmiany te są podłożem procesów patologicznych [7]. Dotyczy to głównie układu krążenia, gdzie zwiększona ekspresja glikokoniugatów prowadzi do przerostu naczyń krwionośnych i wiązania lipoprotein o niskiej gęstości (LDL – *low density lipoproteins*) [20].

W mózgu zmiany te mogą mieć inny przebieg. Syntezowane przez astrocyty proteoglikany i glikoproteiny wydzielane są do przestrzeni międzykomórkowej i wchodzi w skład sieci perineuronalnej [45, 64]. Te siatkowate struktury otaczają perikariony i dendryty, regulują wzrost zakończeń nerwowych i biorą udział w procesach plastyczności neuronalnej [45, 63]. Prawdopodobnie pełnią rolę ochronną w chorobach neurodegeneracyjnych i zapalnych. Molekularne mechanizmy stymulacji syntezy proteoglikanów przez angiotensynę II nie są w pełni poznane. Badania enzymatyczne z użyciem inhibitorów wykazały, że w procesie tym uczestniczy kinaza białkowa C [20]. Poza PKC, w procesie modulacji macierzy pozakomórkowej i cytoszkieletu przez angiotensynę uczestniczą kinazy FAK (FAK – *focal adhesion kinases*) [7, 62, 64]. Angiotensyna II stymuluje aktywację FAK przez kinazy PI3K, co powoduje przeniesienie tych kinaz w okolice błony komórkowej i połączenie z integrynami [7]. Kinazy FAK fosforylują białka paksilinę i tallinę, które uczestniczą w regulacji morfologii komórki. Według Wrighta i wsp. mechanizm ten jest kluczowy w regulacji połączeń synaptycznych w mózgu [64].

Zwiększenie ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę składników macierzy zewnątrzkomórkowej może zachodzić za pomocą dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich, z udziałem kinaz MAP, został już opisany. Angiotensyna II, poprzez receptor AT1 prowadzi do fosforylacji kinaz z rodziny Janus, m.in. kinazy Jak2 i Tyr2 [7]. Połączenie Jak2 z receptorem AT1 zależne jest od aminokwasowej sekwencji YIPP na końcu COOH wewnątrzkomórkowej domeny receptora AT1. Kinaza Jak2 łączy się z cząsteczką STAT1 przez „dok białkowy” p59<sup>Fyn</sup>, co prowadzi do jej fosforylacji i przeniesienia czynnika transkrypcyjnego do jądra komórkowego [7]. Droga przenoszenia sygnału Jak2 – STAT1 może więc wpływać na aktywność genów odpowiedzialnych za wzrost komórek, remodeling cytoszkieletu i syntezę cząsteczek macierzy zewnątrzkomórkowej [7, 17].

Pobudzenie neuronów w procesach uczenia się i pamięci stymuluje również aktywność metaboliczną astrocytów. Komórkom tym przypisuje się głównie funkcje troficzne. Sumners i wsp. wykazali, że wychwyt glukozy może zależeć od angiotensyny II w hodowli astrocytów z okolic podwzgórza i pnia mózgu [62]. Proces ten reguluje receptor AT1 i kinaza białkowa C. Inkubacja angiotensyny II z losartanem i inhibitorami PKC w hodowli astrocytów zmniejsza pobieranie 2-deoksy-[<sup>3</sup>H]glukozy, co potwierdza udział receptora AT1 i związanych z nim mechanizmów sygnalizacyjnych [62]. Angiotensyna II zwiększa syntezę mRNA dla transporterów glukozy GLUT-1, a efekt ten hamuje aktynomycyna D i cykloheksimid. Opisane zjawisko może mieć w mózgu dwojakie znaczenie, co zależy od kierunku metabolizmu glukozy. Po pierwsze, angiotensyna reguluje troficzne właściwości astrocytów. Glukoza stanowi główne źródło energii w mózgu. Indukowana steptozotocyną hipoglikemia osłabia potencjał postsynaptyczny

(EPSP) w regionie CA1 hipokampu i hamuje powstawanie LTP [62]. Badania *in vitro* wykazały, że powstający w astrocytach pirogronian i mleczan jest źródłem energii dla neuronów podczas transmisji synaptycznej i indukcji LTP [32]. Po drugie, proces ten pośrednio wpływa na aktywność neurosekrecyjną neuronów. Powstająca w astrocytach z pirogronianu glutamina przenoszona jest przez transportery glutaminowe do sąsiadujących neuronów i jest wyjściowym substratem do syntezy glutaminianu [48]. Dotychczasowe dane o udziale angiotensyny, insuliny, glukozy i glutaminianu w procesach poznawczych tworzą ciekawy ciąg zależności, jednak prace dotyczące tych zależności są nieliczne. Stymulacja receptora AT1 związana jest z aktywacją kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych, czego wynikiem w różnych tkankach, również w mózgu, jest ekspresja określonych genów i synteza nowych białek.

## ROLA RECEPTORA AT2 W ROZWOJU I AKTYWNOŚCI NEURONÓW

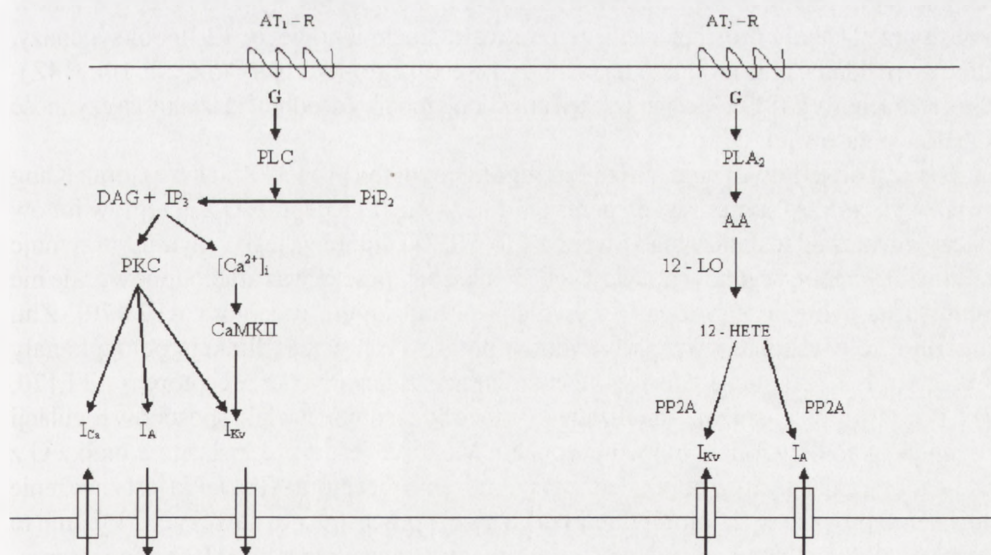
Większość efektów układu renina – angiotensyna odnosi się do receptora AT1, ponieważ występuje on najliczniej w dojrzałych tkankach. Angiotensyna II wykazuje duże powinowactwo do receptora AT2, który najliczniej występuje w tkankach płodowych, a jego ekspresja w tkankach dojrzałych jest ograniczona do niektórych części mózgu, serca, mięśniówki macicy i gruczołów nadnerczy [29]. Największe zagęszczenie receptora AT2 w mózgu zanotowano w środkowo-grzbietowym jądrze wzgórza, przegrodzie bocznej i brzusznej oraz miejscu sinawym, a jego funkcja nie wydaje się być związana z regulacją ciśnienia krwi, pragnienia i sekrecją wazopresyny. Zwiększona ekspresja receptora AT2 w tkankach płodowych wiąże się z jego udziałem w procesach rozwoju i różnicowania tkanek. W wyniku pobudzenia receptora AT2, w przeciwieństwie do AT1, dochodzi do zahamowania wzrostu komórek, nasilenia ich różnicowania i apoptozy, rozkurczu naczyń krwionośnych, regulacji transportu sodu oraz przepływu jonów wapniowych i potasowych przez kanały jonowe [16].

Mimo przeciwstawnego wpływu angiotensyny II w tkankach obwodowych, badania behawioralne z zastosowaniem antagonistów receptorów AT1 i AT2 potwierdziły, że receptor AT2 uczestniczy w procesach poznawczych u szczurów [8]. Zjawisko to wydaje się być interesujące z uwagi na znaczną odrębność mechanizmów sygnalizacyjnych. Dotychczas poznano dosyć dobrze trzy kaskady enzymatyczne, które korelują z odpowiedzią komórkową i funkcjonalną w narządach docelowych. Wiadomo, że receptor AT2 hamuje proliferację komórek i stymuluje apoptozę [28, 29]. W mechanizmach uczestniczących w zahamowaniu wzrostu przez receptor AT2 biorą udział fosfatazy tyrozynowe i fosfatazy serynowo-treoninowe. Z receptorem AT2 związane są trzy fosfatazy, które interferują z kaskadą ERK: MAPKP-1 (MAPKP-1 – *mitogen activated protein kinase phosphatase-1*), PP2A (PP2A – *protein phosphatase 2A*) i SHP-1 (SHP-1 – *SH2 domain-containing phosphatase-1*) [6, 20, 29]. Wynikiem tego procesu jest defosforylacja i inaktywacja cząstek STAT, która prowadzi do zmniejsz-



szenia ekspresji genów *c-fos* i syntezy białka Fos [29]. Badania wykazały, że receptor AT2 wpływa hamująco na wszystkie komponenty kaskady związanej z ERK oraz przeszkadza w autofosforylacji kinaz tyrozynowych [6]. Z zahamowaniem aktywności kinaz białkowych wiąże się również proapoptotyczne działanie receptora AT2. Ważnym ogniwem sygnalizacji po pobudzeniu receptora AT2 jest nasilenie syntezy tlenu azotu i cGMP [55]. Tlenek azotu okazał się ważnym czynnikiem stymulującym rozwój neurytów i różnicowanie się komórek nerwowych w mózgu. Działanie to potwierdzono również na liniach komórkowych PC12W i NG108-15 [29].

Badania behawioralne wykazały także, że stymulacja receptora AT2 wpływa na zachowanie zwierząt doświadczalnych, reguluje odruch pragnienia i aktywność ruchową [24]. Prace ostatnich kilku lat potwierdziły również udział receptora AT2 w procesach poznawczych. Podstawy molekularne efektów pobudzenia receptora AT2 w OUN nie są w pełni wyjaśnione. Jaka jest więc droga przepływu sygnału z receptora AT2 do wnętrza komórki, która stymuluje aktywność poznawczą? Mechanizmy sygnalizacyjne za pośrednictwem receptora AT2 w neuronach i w tkankach nieneuronalnych są podobne. W mózgu, szlaki sygnalizacyjne związane z tym receptorem mają zasadnicze znaczenie w rozwoju tkanki mózgowej i późniejszej komunikacji neuronalnej [29]. Po pierwsze, stymulacja receptora AT2 w rozwijającym się mózgu sprzyja rozwojowi włókien nerwowych i różnicowaniu neuronów. Wykazano, że w komórkach NG108-15 angiotensyna II nasila formowanie mikrotubuli i rozwój wypustek nerwowych. Stymulowany przez receptor AT2 rozwój komórek nerwowych i ich różnicowanie zachodzi



RYCINA 2. Wewnątrzkomórkowy mechanizm regulacji przepływu jonów wapnia i potasu przez kanały jonowe za pośrednictwem receptorów AT1 i AT2, omówienie procesu i objaśnienie skrótów w tekście

prawdopodobnie przez wzrost produkcji tlenu azotu [29]. Endogeny tlenek azotu, który powstaje w odpowiedzi na pobudzenie receptora AT<sub>2</sub>, jest ważnym ogniwem szlaku sygnalizacyjnego, który może regulować wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapniowych oraz fosforylację białek [7]. Prawdopodobnie może on stymulować kinazę ERK. Zjawisko to obserwuje się w komórkach mięśniówki naczyniowej, nie potwierdzono tego jednak w neuronach [7]. Aktywny receptor AT<sub>2</sub> reguluje również czynność kanałów jonowych i ruch jonów przez błonę komórkową neuronu, dając przeciwstawne do receptora AT<sub>1</sub> efekty w przepływie jonów potasowych przez kanały A i kanały o działaniu prostującym (ryc. 2). W komórkach NG108-15 zanotowano również zatrzymanie przepływu jonów wapniowych przez kanały wapniowe typu T [12]. W przypadku receptora AT<sub>2</sub>, czynność kanałów potasowych nie zależy od mechanizmu charakterystycznego dla receptora AT<sub>1</sub> [36]. Otwarcie tych kanałów nie wymaga więc hydrolizy fosfatydyloinozytolu, formowania IP<sub>3</sub> i aktywacji kinazy białkowej C. Jest to zgodne z ogólnie przyjętym założeniem, że receptor AT<sub>2</sub> nie stymuluje hydrolizy fosfatydyloinozytolu i aktywności PKC ani w neuronach, ani w innych tkankach [59]. Badania w hodowlach neuronalnych wskazują na udział fosfodiesterazy i fosfatazy białkowej 2 w regulacji przepływu jonów [59]. Pewny jest fakt, że regulowany przez receptor AT<sub>2</sub> wzrost przepływu jonów potasowych zależy od białka G. Poddanie neuronów w warunkach *in vitro* działaniu toksyny krztuśca lub przeciwciał anti-Gi całkowicie hamuje ruch jonów [36, 70, 71]. Sumners i wsp. wykazali, że pobudzenie receptora AT<sub>2</sub> w hodowli neuronów stymuluje aktywność fosfolipazy A<sub>2</sub>, a w konsekwencji rozkład fosfolipidów komórkowych i zwiększenie poziomu kwasu arachidonowego [57, 58, 59]. Kwas arachidonowy i jego metabolity są znanymi modulatorami przepływu jonów potasowych przez błonę komórkową. Wyniki badań zespołu Sumnersa wskazują, że stymulujący wpływ angiotensyny II na przepływ jonów potasu przez kanały prostujące zależy od kwasu arachidonowego; 12-lipooksygenazy, która go rozkłada, oraz produktu tej reakcji – kwasu 12-(s)-hydroksy-(5Z, 8Z, 10E, 14Z)-eikozatetraenowego [59]. Mechanizm ten prawdopodobnie jest odpowiedzialny za czynność kanałów potasowych typu A.

Nie jest on jedynym mechanizmem regulującym ten proces. Zhu i wsp. oraz Kang i wsp. wykazali, że stymulowany przez angiotensynę II i receptor AT<sub>2</sub> przepływ jonów zależy również od fosfatazy białkowej 2A [36, 70, 71]. Inhibicja tego enzymu zatrzymuje całkowicie przepływ jonów potasowych zwiększony przez kwas arachidonowy, ale nie wpływa na syntezę tego kwasu wywołaną pobudzeniem receptora AT<sub>2</sub> [70]. Zhu sugeruje, że w regulacji przepływu jonów potasowych ważną funkcję pełnią kanały Kv2.2, które uczestniczą także w mechanizmach związanych z receptorem AT<sub>1</sub> [70, 71]. Powyższy mechanizm sygnalizacyjny może być jednym z wielu sposobów regulacji czynności kanałów jonowych w neuronach. Możliwe jest także związanie białka G z podjednostkami kanału w odpowiedzi na pobudzenie receptora AT<sub>2</sub>. Jakie jest znaczenie opisanego procesu w fizjologii tkanki nerwowej i procesów poznawczych? Pytanie to dotyczy funkcjonalnego znaczenia stymulowanych przez receptor AT<sub>2</sub> zmian w przepływie jonów i aktywności neuronalnej. Zwiększony przepływ jonów potasowych przez kanały typu A i kanały o właściwościach prostujących skraca czas trwania potencjału czynnościowego i jednocześnie zwiększa aktywność komórek nerwowych [58, 59].



Dokładne poznanie funkcji receptora AT2 i mechanizmów przekazywania sygnałów za jego pośrednictwem w dojrzałym mózgu może potwierdzić udział angiotensyny II jako neuromodulatora w procesach poznawczych.

## RECEPTOR AT4

Jednym z największych sukcesów w badaniach nad rolą angiotensyn w procesach poznawczych było odkrycie udziału angiotensyny IV w uczeniu się i konsolidacji pamięci. W 1989 roku jako pierwsi wykazaliśmy, że domózgowe podanie angiotensyny IV istotnie poprawia pamięć u szczurów [9]. Spostrzeżenie to zostało wielokrotnie potwierdzone m.in. przez Wrighta i wsp. [64] i Albistona i wsp. [2, 3]. W dwóch modelach amnezji u szczurów, indukowanej chemicznie i chirurgicznie, stymulacja receptora AT4 znacznie poprawia pamięć i zdolności poznawcze u zwierząt w testach behawioralnych.

Angiotensyna IV definiowana była przez szereg lat jako nieaktywny biologicznie produkt rozpadu angiotensyny II. Badania farmakologiczne i molekularne z użyciem radioligandów wykazały, że peptyd ten wiąże się z dużym powinowactwem (1–10 nM) ze specyficznym receptorem oznaczonym jako AT4 [2, 3]. Nasiloną ekspresję receptora AT4 zaobserwowano w płatach czołowych, śródmózgowiu, jądrze Meynerta, korze nowej i polach CA1 i CA3 hipokampu, co może wskazywać ścisły związek angiotensyny IV i receptora AT4 z funkcjami poznawczymi [14]. W wyniku szczegółowej analizy budowy i lokalizacji receptora AT4 odrzucono początkową tezę o jego strukturalnym podobieństwie do receptorów AT1 i AT2. Angiotensynę IV wiąże glikoproteina o m.c. 165 kDa, która ma tylko jeden region przezbłonowy. Analiza biochemiczna i farmakologiczna przeprowadzona przez Albistona i wsp. określiła receptor AT4 jako aminopeptydazę błonową, której aktywność reguluje insulina (IRAP – *insulin regulated aminopeptidase*) [3]. Komórki transfekowane cDNA dla IRAP wiążą z dużym powinowactwem angiotensynę IV [3]. Zarówno ekspresja mRNA, jak i synteza IRAP w mózgu są identyczne z rozmieszczeniem miejsc wiążących angiotensynę IV.

Jaki jest więc udział tego nietypowego receptora angiotensynowego w procesie uczenia się i pamięci? Badania z wykorzystaniem potencjalnych inhibitorów i substratów IRAP wykazały, że aktywność tego enzymu może mieć kluczowe znaczenie w procesach poznawczych. Substraty IRAP – wazopresyna, somatostatyna i cholecystokina-8 w testach behawioralnych ułatwiają uczenie się gryzoni [40]. Usprawnienie procesów poznawczych przez domózgowe podanie angiotensyny IV lub jej analogów może być przynajmniej częściowo efektem ochrony neuroaktywnych peptydów przed rozkładem enzymatycznym [3]. Agoniści receptora AT4, angiotensyna IV i LVV-hemorfinina 7, łącząc się z miejscem aktywnym IRAP, całkowicie hamują jego aktywność enzymatyczną [2]. Dokładna analiza ekspresji IRAP w komórkach wrażliwych na insulinę wykazała, że enzym ten pierwotnie występuje w pęcherzykach post-endosomalnych i sieci *trans*-Golgi, które zawierają zależny od insuliny transporter glukozy GLUT4. W mózgu rozmieszczenie IRAP jest podobne do lokalizacji GLUT4 i

koncentruje się głównie w hipokampie i korze nowej [3]. W odpowiedzi na insulinę, pęcherzyki zawierające GLUT4 i IRAP przemieszczają się w kierunku błony komórkowej i łączą się z nią. Mechanizm tego zjawiska jest podobny do uwalniania neurotransmiterów w synapsie nerwowej [11]. Wspólna lokalizacja IRAP i GLUT4 w tym samym neuronie i ich podobna reakcja na insulinę może sugerować udział tych cząstek w formowaniu pamięci. Nie wiadomo, czy zahamowanie aktywności IRAP przez angiotensynę IV zwiększa czynność transporterów GLUT4, ale jest to prawdopodobne [3]. Nie ulega jednak wątpliwości, że glukoza może warunkować aktywność neuronów i syntezę neurotransmiterów uczestniczących w procesach poznawczych, np. acetylocholino [3]. Według Lee i wsp. angiotensyna IV zwiększa wydzielanie acetylocholino, prawdopodobnie przez swój wpływ na aktywność IRAP [43]. Podsumowując, modulacja IRAP i GLUT4 przez angiotensynę IV może poprawiać zdolności poznawcze poprzez zwiększenie okresu półtrwania endogennych neuropeptydów zwiększających pamięć oraz regulację transportu i metabolizmu glukozy [3]. Niezależnie od tego, uwagę skupia fakt, że angiotensyna IV może regulować mechanizm związany z kinazami MAP. Handa i wsp. wykazali, że w hodowli cholinergicznym komórek linii Sn56 angiotensyna IV zwiększa aktywność kinaz MAP i czynników transkrypcyjnych [26, 3]. Dokomorowe podanie angiotensyny IV stymuluje ekspresję genu *c-fos* w polach CA1 i CA3 hipokampu. Potwierdzono również, że stymulacja tego receptora w hipokampie zwiększa transmisję synaptyczną i indukuje LTP, co wiąże się z bezpośrednim udziałem w plastyczności neuronalnej [41].

## PODSUMOWANIE

Badania behawioralne i biochemiczne procesów poznawczych przyniosły duży postęp wiedzy w tej dziedzinie. Poznano regiony mózgu odpowiedzialne za uczenie się i pamięć oraz szereg czynników endo- i egzogennych, które mogą modyfikować te procesy. Odkrywane są stopniowo poszczególne elementy złożonego mechanizmu molekularnego związanego z konsolidacją pamięci. Znany jest mechanizm przekazywania sygnału z receptorów związanych z czynnościami umysłowymi, od jego rozpoznania przez komórki i przetworzenia przy udziale przekaźników do zmiany ekspresji genów, syntezy białek i kodowania informacji. W szlaku prowadzącym do indukcji aktywności genów regulujących syntezę „białek pamięci” głównym ogniwem jest grupa kinaz MAP, za pośrednictwem których jest przekazywany sygnał komórkowy bezpośrednio do jądra komórkowego, aktywuje ona czynniki transkrypcji STAT, CREB i AP-1 oraz zwiększa ekspresję genów *c-fos* i *c-jun*. W ostatnich latach badania dostarczyły również dowodów na to, że angiotensyna II i IV mogą ułatwiać uczenie się i zapamiętywanie. Pomimo znacznych osiągnięć w badaniach nad rolą angiotensyn na poziomie komórki, niewiele wiadomo, w jaki dokładnie sposób peptydy te regulują procesy poznawcze *in vivo* w mózgu. Z badań *in vitro* wynika, że istotnym ogniwem łańcucha odbierania i przekazywania sygnału z receptora AT1 jest zwiększenie aktywności kinaz MAP i czynników transkrypcyjnych oraz syntezy białka. Prokognitywne działanie angiotensyny IV, potwierdzone



w licznych badaniach behawioralnych, może wiązać się z zatrzymaniem rozkładu neuroprzekazników uczestniczących w formowaniu pamięci oraz regulacją metabolizmu glukozy.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALBERINI CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 2005; **1**: 51–56.
- [2] ALBISTON AL, MCDOWALL SG, MATSACOS D, SIM P, CLUNE E, MUSTAFA T, LEE J, MENDELSON FAO, SIMPSON RJ, CONNOLLY LM, CHAI SY. Evidence that the angiotensin IV ( $AT_4$ ) receptor is the enzyme insulin regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 48623–48626.
- [3] ALBISTON AL, MUSTAFA T, MCDOWALL SG, MENDELSON FAO, LEE J, CHAI SY.  $AT_4$  receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanism of memory enhancement. *Trends Endocrinol Metab* 2003; **2**: 72–77.
- [4] ALLEN AM, MAC GREGOR DP, MC KINLEY MJ, MENDELSON FAO. Angiotensin II receptors in the human brain. *Regul Pept* 1999; **79**: 1–7.
- [5] ARNSTEN AFT, RAMOS BP, BIRNBAUM SG, TAYLOR JR. Protein kinase A as a therapeutic target for memory disorders: rationale and challenges. *Trends Mol Med* 2005; **11**: 121–128.
- [6] BEDECS K. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinases cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J* 1997; **325**: 449–454.
- [7] BERRY C, TOUYZ R, DOMINICZAK AF, WEBB RC, JOHNS DG. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **281**: H2337–H2365.
- [8] BRASZKO JJ.  $AT_2$  but not  $AT_1$  receptor antagonism abolishes angiotensin II increase of the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. *Behav Brain Res* 2002; **131**: 79–86.
- [9] BRASZKO JJ, KUPRYSZEWSKI G, WITCZUK B, WIŚNIEWSKI K. Angiotensin II (3-8)-hexapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats. *Neuroscience* 1988; **27**: 777–783.
- [10] BROWN D CH, STEWARD LJ, GE J, BARNES NM. Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via  $AT_1$  receptor *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1996; **118**: 414–420.
- [11] BRYANT NJ. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 267–277.
- [12] BUISSON B, LAFLAMME L, BOTTARI SP, DE GASPARO M, GALLO PAYET N, PAYET MD. A G protein is involved in the angiotensin  $AT_2$  receptor inhibition of T-type calcium currents in non-differentiated NG108-15 cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1670–1674.
- [13] CHAI SY. Angiotensin  $AT_4$  receptor distribution in mouse brain is possible role in facilitation of spatial memory. *J Neurochem* 2001; **78**: 15.
- [14] CHAI SY. Distribution of angiotensin IV binding sites ( $AT_4$  receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualized by *in vitro* receptor autoradiography. *J Chem Neuroanat* 2000; **20**: 339–348.
- [15] DE GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW, UNGER T. International Union of Pharmacology XXII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; **278**: E357–E374.
- [16] DIMMELER S, RIPPMMANN V, WIELAND U, HEANDELER J, ZEIHNER AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997; **81**: 970–976.
- [17] DINH DT, FRAUMAN AG, JOHNSTON CI, FABIANI ME. Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clin Sci* 2001; **100**: 481–492.
- [18] DULIN NO. Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8098–8102.
- [19] FIGUEROA JE, VIJAYAGOPAL P. Angiotensin II stimulates synthesis of vascular smooth muscle cell proteoglycans with enhanced low density lipoprotein binding properties. *Atherosclerosis* 2002; **162**: 261–268.
- [20] FISCHER TA. Role of  $AT_1$  and  $AT_2$  receptors in regulation of MAPK and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1998; **275**: H906–H916.
- [21] FLEEGAL MA, SUMNERS C. Angiotensin II stimulates neuronal jun expression and c-Jun  $NH_2$  terminal kinase via different intracellular signaling pathway. *Soc Neurosci Abstr* 2000; **26**: 149.18

- [22] GALLINAT S, BUSCHE S, SCHUTZE S, KRONKE M, UNGER T. AT<sub>2</sub> receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett* 1999; **443**: 75–79.
- [23] GALLINAT S, BUSCHE S, YANG H, RAIZADA MK, SUMNERS C. Gene expression profiling of rat brain neurons reveals angiotensin II-induced regulation of calmodulin and synapsin 1. possible role in neuromodulation. *Endocrinology* 2001; **142**: 1009–1016.
- [24] GARD PR. The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *Eur J Pharm* 2002; **438**: 1–14.
- [25] GELBAND CH, WARTH JD, MASON H. Angiotensin II type 1 receptors mediated K<sup>+</sup> channel subunit kv2.2 in brain stem and hypothalamic neurons. *Circ Res* 1999; **84**: 352–359.
- [26] HANDA RK. Characterization and signaling of the AT<sub>4</sub> receptor in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 440–449.
- [27] HOHLE S, BLUME A, LEBRUN C, CULMAN J, UNGER T. Angiotensin receptors in the brain. *Pharmacol Toxicol* 1995; **77**: 306–315.
- [28] HORIUCHI M, HAYASHIDA W, KAMBE T, YAMADE T, DZAU VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates bcl-2 by activating mitogen activated protein kinase phosphatase-1 and inducing apoptosis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19022–19026.
- [29] HORIUCHI M, LEHTONEN JYA, DAVIET L. Signalling mechanism of the AT<sub>2</sub> angiotensin receptor: crosstalk between AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in cell growth. *Trends Endocrinol Met* 1999; **10**: 391–396.
- [30] HUANG XC, DENG T, SUMNERS C. Angiotensin II stimulates activation of Fos regulating kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in neuronal cultures from rat brain. *Endocrinology* 1998; **139**: 245–251.
- [31] HUANG XC, RICHARDS EM, SUMNERS C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem* 1999; **443**: 75–79.
- [32] IZUMI Y, KATSUKI H, ZORUMSKI CHF. Monocarboxylates (pyruvate and lactate) as alternative energy substrates for induction of long-term potentiation in rat hippocampal slice. *Neurosci Lett* 1997; **232**: 17–20.
- [33] JONES LS. Integrins: possible function in the adult CNS. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 68–72.
- [34] KACZMAREK L, ŁAPIŃSKA-DZWONEK J, SZYM CZAK S. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO* 2002; **16**: 6643–6648.
- [35] KANDEL ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001; **294**: 1030–1038.
- [36] KANG J, POSNER P, SUMNERS C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K<sup>+</sup> currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 1994; **267**: C1389–C1397.
- [37] KANSAS GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; **88**: 3259–3287.
- [38] KARWOWSKA -POLECKA W, KUŁAKOWSKA K, WIŚNIEWSKI K, BRASZKO JJ. Losartan influences behavioural effects of angiotensin II (3-7) in rats. *Pharmacol Res* 1997; **36**: 275–283.
- [39] KENWRICK S, DOHERTY P. Neural cell adhesion molecule L1 relating disease to function. *Bioessays* 1998; **20**: 668–671.
- [40] KOVACS GL, DE WIED D. Peptideric modulation of learning and memory processes. *Pharmacol Rev* 1994; **46**: 269–291.
- [41] KRAMAR EA, ARMSTRONG DL, IKEDA S, WAYNER MJ, HARDING JW, WRIGHT JW. The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus *in vitro*. *Brain Res* 2001; **897**: 114–121.
- [42] KUŁAKOWSKA A, KARWOWSKA W, WIŚNIEWSKI K, BRASZKO JJ. Losartan influences behavioural effects of angiotensin II in rats. *Pharmacol Res* 1996; **34**: 109–115.
- [43] LEE J, CHAI SY, MENDELSON FAO, MORRIS MJ, ALLEN AM. Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. *Neuropharmacology* 2001; **40**: 618–623.
- [44] LEVITAN IB. Modulation of ion channels by protein phosphorylation. How the brain works. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1999; **33**: 3–22.
- [45] LIGUZ-ŁĘCZNA M. Sieci perineuronalne – zagadkowe struktury w układzie nerwowym. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 119–128.
- [46] MOELLENHOFF E, BLUME A, CULMAN J, CHATTERJEE B, HERDEGEN T, LEBRUN CHJ, UNGER T. Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-fos and AT receptor expression in the rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **280**: R1095–R1104.
- [47] PAN SJ, SUMNERS C, GELBAND CH. Kv1.4 underlies angiotensin II-mediated inhibition of neuronal A-type K<sup>+</sup> current. *Biophys J* 2000; **78**: 2655.
- [48] PELLERIN L. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* 2003; **43**: 331–338.



- [49] PESSIN JE. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. *J Biol Chem* 1999; **274**: 2593–2596.
- [50] RADWAŃSKA K, NIKOLAEV E, KNARSKA E, KACZMAREK L. Differential response of two subdivisions of lateral amygdala to aversive conditioning as revealed by c-Fos and P-ERK mapping. *Neuroreport* 2002; **3**: 2241–2246.
- [51] RICHARDS EM, RAIZADA MK, GELBAND CH, SUMNERS C. Angiotensin II type 1 receptor-modulated signaling pathways in neurons. *Mol Neurobiol* 1999; **19**: 25–41.
- [52] RODRIGUES SM, SCHAFFE GE, LE DOUX JE. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 2004; **44**: 75–91.
- [53] RONN LC, BOCK E, LINNEMANN D, JAHNSSEN H. NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res* 1995; **677**: 145–151.
- [54] SAAVEDRA JM, TIMMERMANS PBWM. Angiotensin receptors. Plenum Press 1994, New York and London.
- [55] SIRAGY HM, CAREY RM. The subtype 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 1997; **100**: 264–269.
- [56] STADLER T, VELTMAR A, QUADRI F, UNGER T. Angiotensin II evokes noradrenaline release from the paraventricular nucleus in conscious rats. *Brain Res* 1992; **569**: 117–122.
- [57] SUMNERS C, FLEEGAL MA, ZHU DN. Angiotensin AT<sub>1</sub> receptor signaling pathways in neurons. *Clin Exp Pharm Physiol* 2002; **29**: 483.
- [58] SUMNERS C, GELBAND CH. Neuronal ion channel signaling pathway: modulation by angiotensin II. *Cell Signal* 1998; **10**: 303–311.
- [59] SUMNERS C, ZHU M, GELBAND POSNER P. Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents: intracellular mechanisms. *Am J Physiol* 1996; **271**: C154–C163.
- [60] TAKAICHI M. Cadherins: a molecular family important in selective cell – cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; **59**: 237–252.
- [61] TANG L, HUNG CP, SCHUMAN EM. A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 1998; **20**: 1165–1175.
- [62] TANG W, RICHARDS EM, RAIZADA MK, SUMNERS C. Angiotensin II increases glucose uptake and glucose transporter-1 mRNA levels in astroglia. *Am J Physiol* 1995; **268**: E384–E390.
- [63] WRIGHT JW, HARDING JW. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol* 2004; **72**: 263–293.
- [64] WRIGHT JW, KRAMAR EA, MEIGHAN SE, HARDING JW. Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* 2002; **23**, 221–246.
- [65] YANG H, LU D, YU K, RAIZADA MK. Regulation of neuromodulatory action of angiotensin II in the brain neurons by the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 1996; **16**: 4047–4058.
- [66] YANG SN, LIPPOLDT A, JANSSEN A, PHILLIPS MI, GANTEN D. Localisation of angiotensin AT<sub>1</sub> receptor-like immunoreactivity in catecholaminergic neurons of the rat medulla oblongata. *Neurosci* 1997; **81**: 503–515.
- [67] YU K, LU D, ROWLAND NE, RAIZADA MK. Angiotensin II regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 1996; **137**: 1566–1576.
- [68] ZHAO WQ. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **177**: 125–134.
- [69] ZHU DN, MORIGUCHI A, MIKAMI H, HIGAKI J, OGIHARA T. Central amino acids mediate cardiovascular response to angiotensin II in the rat. *Brain Res Bull* 1998; **45**: 189–197.
- [70] ZHU M, GELBAND CH, MOORE JM, POSNER P, SUMNERS C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed – rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J Neurosci* 1998; **18**: 679–686.
- [71] ZHU M, GELBAND CH, POSNER P, SUMNERS C. Angiotensin II decreases neuronal delayed rectifier potassium current: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurophysiol* 1999; **82**: 1560–1568.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 22.12.2005 r.

Przyjęto: 15.03.2006.

Ul. Waszyngtona 15A, 15-274 Białystok





## MELANOPSYNA – NOWO ODKRYTY CHRONOBIOLOGICZNY RECEPTOR ŚWIATŁA\*

### MELANOPSIN: A NEWLY DISCOVERED PHOTORECEPTOR CONTROLLING CIRCADIAN RHYTHMS

Jolanta B. ZAWILSKA<sup>1,2</sup>, Karolina CZARNECKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego,

<sup>2</sup>Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

*Streszczenie:* Siatkówka oka jest tkanką wyspecjalizowaną do odbioru informacji świetlnej. W oku kręgowców występują dwa anatomicznie i funkcjonalnie odmienne szlaki odbioru światła. Pierwszy z nich, oparty na fotodetekcji pręcików i czopków, służy do tworzenia obrazów (tzw. fotodetekcja wzrokowa). W drugim układzie fotony światła są wychwytywane przez melanopsynę, nowo odkryty barwnik wzrokowy z rodziny opsyn. Układ ten rejestruje zachodzące w czasie zmiany w intensywności promieniowania i uczestniczy w tzw. niewzrokowych odpowiedziach na światło (regulacja rytmów biologicznych, odruch zwężenia źrenicy). Przypuszcza się, że w dojrzałej siatkówce systemy widzenia wzrokowego i niewzrokowego wzajemnie ze sobą współpracują. U ssaków melanopsyna występuje w małej subpopulacji światłoczułych komórek zwojowych siatkówki (ipRGCs), które dzięki rozbudowanemu drzewu dendrytycznemu mogą zbierać informacje świetlne z obszaru całej siatkówki. W rozwoju osobniczym ssaków tzw. widzenie niewzrokowe, pozwalające na synchronizację rytmów okołodobowych z warunkami oświetlenia środowiska, pojawia się jako pierwsze, wyprzedzając rozwój klasycznego systemu wzrokowego. Podobnie jak opsyny bezkręgowców, melanopsyna prawdopodobnie pełni podwójną funkcję fotobarwnika i fotoizomeryzy retinalu. W komórkach zawierających melanopsynę pod wpływem światła dochodzi do długo utrzymującej się depolaryzacji, będącej wynikiem aktywacji białka G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> i fosfolipazy C. Obserwowany wzrost stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> zależy również od uruchomienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, jak i otwarcia kanałów kationowych typu TRPC.

*Słowa kluczowe:* melanopsyna, komórki zwojowe siatkówki, pręciki, czopki, siatkówka, widzenie, rytmy okołodobowe.

*Summary:* The visual system is now known to be composed of two anatomically and functionally distinct pathways, i.e. the image-forming and non-image-forming. Photoreception of the image-forming pathway

\*Praca finansowana przez MEiN (grant nr 2 PO6D 025 29) i Uniwersytet Medyczny w Łodzi (projekt nr 502-13-409).

begins with rods and cones, classical photoreceptors, whereas that for the non-image-forming pathway is predominantly based on intrinsically photosensitive retinal cells containing the newly discovered photopigment – melanopsin. The non-image-forming visual system poorly responds to brief light stimuli, and by integrating photic energy over longer periods of time it is capable of controlling various circadian rhythms. Accumulating experimental evidence suggests that at least in mammals the non-image-forming and image-forming pathways are merged, and influence the activity of each other. In mammals, melanopsin is expressed in a small population of intrinsically photoreceptive retinal ganglion cells (ipRGCs). The ipRGCs are light responsive from birth, long before the functional development of classical photoreceptors and the image-forming visual pathway. The photosensitivity of melanopsin relies on the presence of *cis*-isoforms of retinaldehyde. By analogy to invertebrate opsins, melanopsin acts as a bistable pigment, having both sensory and photoisomerase regeneration functions. The transduction pathway triggered by melanopsin results in a sustained increase in intracellular calcium. This calcium increase is mediated through a  $G_q/G_{11}$  – phospholipase C –  $IP_3$  pathway, and additionally involves activation of nonselective cation channels TRPC.

*Key words:* melanopsin, retinal ganglion cells, rods, cones, retina, vision, circadian rhythms.

## WSTĘP

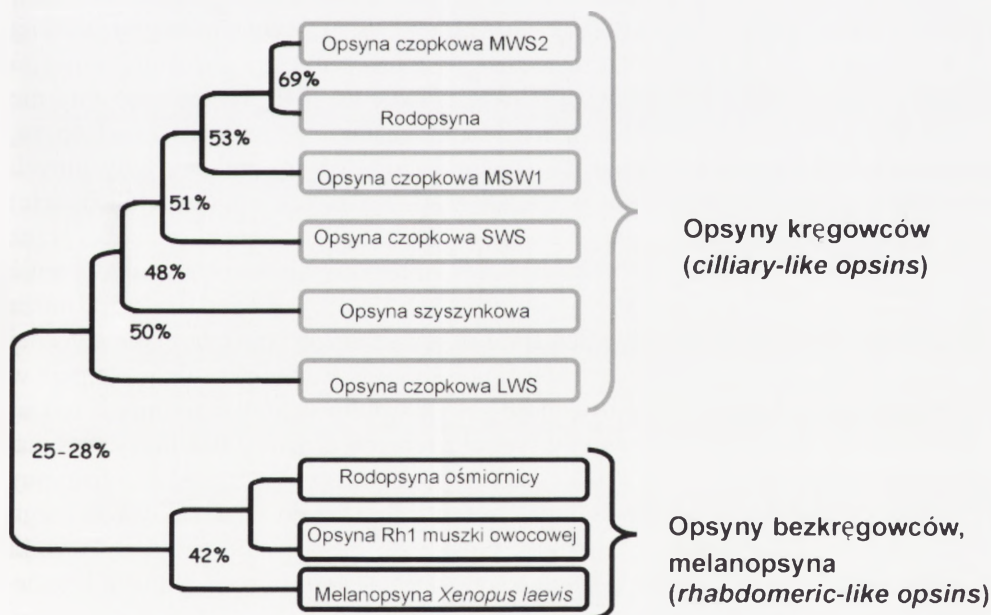
Siatkówka oka jest tkanką wyspecjalizowaną do odbioru informacji świetlnej. Do niedawna uważano, że jedynymi fotoreceptorami w siatkówce kręgowców są pręciki i czopki. Segmenty zewnętrzne tych komórek, zawierające barwniki wzrokowe z rodziny opsyn, po pochłonięciu fotonów światła uruchamiają kaskadę procesów, w której sygnał świetlny przekształcany jest w sygnały neuronalne. Sygnały te, po integracji i modulacji w warstwach neuronalnych siatkówki, są zbierane przez komórki zwojowe i następnie przesyłane nerwem wzrokowym do mózgu. Pierwsze informacje wskazujące na obecność w oku dodatkowego systemu detekcji światła, który wykorzystuje receptory inne niż czopki i pręciki, pojawiły się w latach dziewięćdziesiątych XX wieku. Pochodziły one z badań nad mechanizmami świetlnej regulacji rytmów okołodobowych. W doświadczeniach przeprowadzonych na zmodyfikowanych genetycznie szczepach myszy (*rd/rd*, *rd/rd cl*) wykazano, że utrata pręcików i czopków nie zmienia chronobiologicznych odpowiedzi zwierząt na światło (takich jak: supresja nocnych poziomów melatoniny, hamowanie nocnej aktywności ruchowej, synchronizacja rytmu aktywności ruchowej do cyklu oświetlenia, przesunięcia faz okołodobowego rytmu aktywności ruchowej), a także nie wpływa na odruch zwężenia źrenicy pod wpływem światła [7,16,17,37,39,45,69]. Ponadto, w badaniach klinicznych zaobserwowano, że u niektórych osób niewidomych zachowana jest zdolność do regulacji przez światło syntezy melatoniny, rytmu sen-czuwanie oraz dobowych oscylacji poziomów kortyzolu w osoczu [10,36]. Te pionierskie prace stanowiły podstawę do wysunięcia hipotezy, że przynajmniej w siatkówkach ssaków występuje nieopisany dotąd system odbioru i kodowania informacji świetlnej. System ten, w przeciwieństwie do układu opartego na fotodetekcji klasycznych fotoreceptorów i wykorzystywanego do tworzenia obrazów (tzw. fotodetekcja wzrokowa; *image-forming photoreceptor system* lub *visual photoreceptor system*), służy do pomiaru zmieniającej się w czasie intensywności promieniowania świetlnego i odbiera fotony światła w innych celach niż tworzenie obrazów wzrokowych



(*non-image-forming photoreceptor system; non-visual photoreceptor system*). Wyniki kilkuletnich poszukiwań niewzrokowych (okołodobowych) fotoreceptorów pozwalają sądzić, że u ssaków rolę tę pełni mała populacja komórek zwojowych wykorzystująca nowo odkryty barwnik – melanopsynę [5,6,15,16,34,56,63].

## BUDOWA MELANOPSYNY

Melanopsynę po raz pierwszy sklonowano w 1998 r. z mRNA pochodzącego z melanoforów skóry żaby szponiastej (*Xenopus laevis*); cechą charakterystyczną tych komórek jest bezpośrednia wrażliwość na światło [51]. Nazwa melanopsyna (ang. *melanopsin*) odzwierciedla zarówno pierwotne źródło izolacji peptydu, jak i fakt, że należy on do grupy opsyn. Gen kodujący melanopsynę oznaczono symbolem *Opn4* [51]. Melanopsyna *Xenopus* zbudowana jest z 534 reszt aminokwasowych (aa). U kurczęcia wykryto dwa geny kodujące melanopsynę – *cOpn4-a* i *cOpn4-b*, których ekspresja jest zróżnicowana. Dominujący *cOpn4-a* koduje białko zbudowane z 543 aa. Z kolei *cOpn4-b*, który w porównaniu z *cOpn4-a* po nukleotydzie 1242 ma sekwencję 86 par



RYCINA 1. Schemat drzewa filogenetycznego opsyn opartego na budowie struktury I-rzędowej domen transbłonowych TM1-7 białek. Dane dla opsyn kręgowców przedstawiają stopień podobieństwa pomiędzy opsynami kurczęcia: MWS1 (ang. *middle-wavelength-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie niebieskie; MWS2 (ang. *middle-wavelength-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie zielone; SWS (ang. *short-wave-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie fioletowe; LWS (*long-wave-sensitive*) – opsyna wrażliwa na promieniowanie czerwone. Wartości liczbowe przedstawiają procent homologii struktury I-rzędowej pomiędzy poszczególnymi opsynami [16,51]

zasad z „przedwczesnym” kodonem stop, odpowiada za syntezę krótszego białka zbudowanego z 425 aa [67]. Także u przedstawiciela gromady ryb – dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*) występują dwa odrębne geny kodujące syntezę melanopsyny, *Opn4a* i *Opn4b*, o zróżnicowanej ekspresji tkankowej i komórkowej [12]. Dotychczas sklonowane melanopsyny kręgowców (dorsza, danio pęgowanego, żaby szponiastej, kurczęcia, myszy, szczura, człowieka) wykazują znacznie więcej homologii strukturalnej z opsynami bezkręgowców (około 40%) niż z opsynami kręgowców (do 30%) [4,9,12,16,28,51,52]. Analiza filogenetyczna wskazuje na to, że melanopsyna i opsyny bezkręgowców prawdopodobnie wywodzą się od wspólnego przodka [51]. W obrębie rodziny scharakteryzowanych dotychczas melanopsyn stopień homologii struktury I-rzędowej dla białek różnych gatunków kręgowców wynosi 60–70%.

Szczegółowa analiza budowy melanopsyny wskazuje, że należy ona do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G [31,51]. Łańcuch białkowy siedmiokrotnie przechodzi przez błonę komórkową tworząc w obrębie błony siedem hydrofobowych domen transbłonowych (TM) połączonych naprzemiennie pętlami cytoplazmatycznymi i zewnątrzkomórkowymi. *N*-końcowy fragment białka znajduje się w obszarze zewnątrzkomórkowym, a fragment *C*-końcowy w cytoplazmie. Podobnie jak u innych opisanych dotychczas białek z rodziny opsyn, w siódmej domenie TM melanopsyny występuje lizyna (*Lys*<sup>294</sup>), do której przyłącza się chromofor (najprawdopodobniej 11-*cis*-retinal) tworząc zasadę Schiffa. Reszty cysteinowe (*Cys*<sup>100</sup> i *Cys*<sup>178</sup>), obecne w drugiej i trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej, uczestniczą w tworzeniu mostka dwusiarczkowego stabilizującego strukturę III-rzędową białka. W obrębie *N*-końca melanopsyny nie występują natomiast miejsca *N*-glikozylacji, które są charakterystyczne dla innych opsyn. Melanopsyna *Xenopus*, podobnie jak i sklonowane później melanopsyny innych gatunków zwierząt, ma długi *C*-koniec, w którym występują liczne miejsca (kilkanaście) mogące ulegać fosforylacji. Sugeruje to możliwość regulacji aktywności białka przez kinazy. Analogicznie do opsyn bezkręgowców, melanopsyna ma w trzeciej domenie transbłonowej (TM3) aromatyczny aminokwas – tyrozynę (*Tyr*<sup>103</sup>), która może uczestniczyć w stabilizacji zasady Schiffa. Z kolei w trzeciej pętli cytoplazmatycznej obecny jest charakterystyczny fragment *Asn*<sup>225</sup> – *Gly*<sup>233</sup>, wstawka ta nie występuje w opsynach kręgowców [51]. Budowa tej pętli w znacznym stopniu determinuje rodzaj białka G, na który będzie przenoszony sygnał z receptora światła, jakim jest opsyna. Obecność fragmentu *Asn*<sup>225</sup> – *Gly*<sup>233</sup> w białku melanopsyny sugeruje, że uruchamiany przez nią szlak transdukcji sygnału może być analogiczny do szlaku aktywowanego przez opsyny bezkręgowców. Słuszność powyższej hipotezy potwierdziły wyniki najnowszych badań przeprowadzonych na oocytach *Xenopus laevis* i liniach komórkowych, w których dokonano ekspresji genu *Opn4* [41,47,54].

## WYSTĘPOWANIE

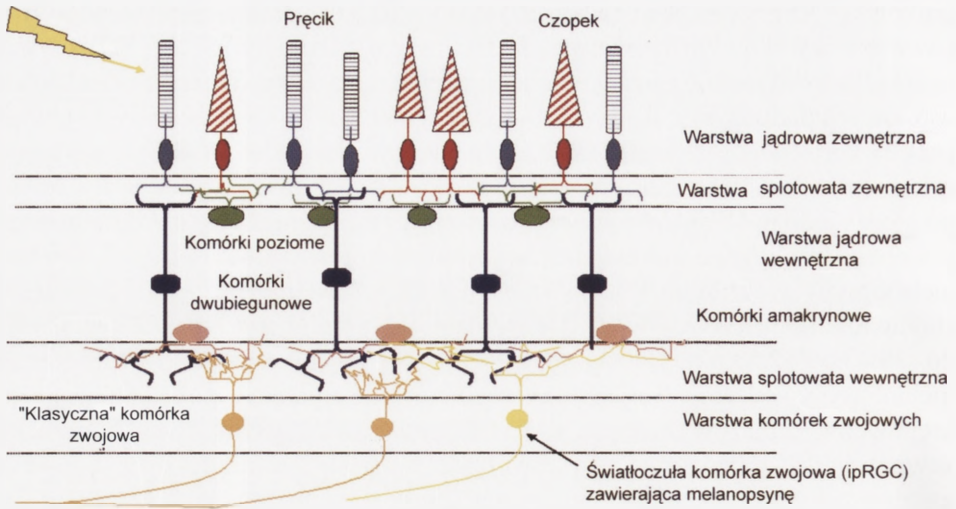
Wykorzystując techniki immunohistochemiczne oraz hybrydyzacji *in situ* obecność melanopsyny wykazano w melanoforach skóry, oku (siatkówce, nabłonku barwnikowym



siatkówki – RPE i w tęczówce) i w mózgu (jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza i wielkokomórkowym jądrze przedwzrokowym) *Xenopus laevis* [51]. U dorsza atlantyckiego ekspresję genu *Opn4a* stwierdzono w siatkówce i w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza, natomiast ekspresję genu *Opn4b* – w siatkówce i w uzdeczce [12]. U kury (*Gallus domesticus*) melanopsyna występuje w siatkówce, szyszynce i mózgu (przegrodzie, uzdeczce, wzgórzu, prążkowi, jądrze przedwzrokowym, obszarze pomiędzy jądrem okrągłym a jądrem kolankowatym bocznym oraz obszarze pomiędzy pokrywą wzrokową a jądrem soczewkowatym śródmózgowia) [1,9,67]. Obecność melanopsyny stwierdzono ponadto w siatkówkach ssaków (myszy, szczura, kretoszczura, chomika, kota, makaka, człowieka) i ryby (danio pęgowany; ang. *zebrafish*) [4,11,13,22–26, 28,43,49,52,53,62]. Należy podkreślić, że w obrębie siatkówki rozmieszczenie melanopsyny wykazuje bardzo duże zróżnicowanie pomiędzy badanymi gromadami kręgowców. U płazów (*Xenopus laevis*) obecność melanopsyny stwierdzono w RPE, zewnętrznej części warstwy jądrowej wewnętrznej i w nielicznych komórkach zwojowych [51]. W siatkówkach ryb<sup>1</sup> melanopsyna występuje w komórkach poziomych i amakrynowych (warstwa jądrowa wewnętrzna) oraz w komórkach zwojowych [4,12]. U ptaków (kura domowa) obecność melanopsyny wykazano głównie w warstwie jądrowej wewnętrznej siatkówki (przypuszczalnie w perikarionach komórek poziomych i dwubiegunowych), a ponadto w warstwie jądrowej zewnętrznej (komórki fotoreceptorowe) i, w znacznie mniejszym stopniu, w komórkach zwojowych oraz w RPE [9,67]. Z kolei u ssaków melanopsyna występuje przede wszystkim w komórkach zwojowych siatkówki oraz w pojedynczych komórkach amakrynowych położonych pomiędzy warstwą komórek zwojowych a warstwą jądrową wewnętrzną [3,11,13,20,24,-26,28,49,52,53].

Badania przeprowadzone w okresie ostatnich kilku lat wykazały, że w siatkówkach ssaków występuje mała (licząca, w zależności od gatunku i wieku, od ułamka do kilkunastu procent ogólnej liczby) populacja komórek zwojowych mających zdolność do bezpośredniego pochłaniania fotonów światła (ang. *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*; ipRGCs). Komórki te odgrywają kluczową rolę w regulacji tzw. niewzrokowych odpowiedzi na światło (ang. *non-visual photic responses*; *non-image forming photic responses*), takich jak: hamowanie syntezy melatoniny, regulacja okołodobowego rytmu aktywności ruchowej, zwężanie źrenicy [5,6,18,30,38]. Co najmniej 80% ipRGCs zawiera melanopsynę [5]. W siatkówce człowieka komórki zawierające melanopsynę stanowią 0,2–0,8% całkowitej populacji komórek zwojowych. Ich gęstość wynosi 3–5 komórek/mm<sup>2</sup> na obwodzie siatkówki i 20–25 komórek/mm<sup>2</sup> w części dołkowej [11]. W siatkówkach ssaków, w tym także w siatkówce człowieka, przeważająca część komórek zwojowych zawierających melanopsynę wykazuje ekspresję PACAP [13,24,26] – polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylnową (ang. *pituitary adenylate cyclase – activating polypeptide*). Należy podkreślić, że PACAP jest uważany za neurochemiczny marker szlaku siatkówkowo-

<sup>1</sup>U dorsza atlantyckiego ekspresję genu *Opn4a* zaobserwowano w komórkach poziomych, amakrynowych i zwojowych siatkówki, a ekspresję genu *Opn4b* – w komórkach amakrynowych i zwojowych [12].



RYCINA 2. Schemat budowy siatkówki ssaków. Światłoczułe komórki zawierające melanopsynę wyróżniają się z grupy komórek zwojowych rozbudowanym drzewem dendrytycznym. Komórki te mogą odbierać sygnały pochodzenia czopkowego i pręcikowego. Pozostałe objaśnienia w tekście ([5,63] zmodyfikowano)

podwzgórzowego [21]. Melanopsyna występuje w błonie komórkowej subpopulacji komórek zwojowych, głównie w obrębie dendrytów oraz perikarionów [24,28]. Perikariony nielicznych komórek melanopsynowych znajdują się w warstwie jądrowej wewnętrznej [28]. Najbardziej uderzającą cechą morfologiczną ipRGCs jest ich szerokie drzewo dendrytyczne, najbardziej rozbudowane w grupie wszystkich komórek zwojowych. Większość komórek zwojowych zawierających melanopsynę ma dwa lub trzy główne, długie dendryty rozgałęziające się w warstwie splotowatej wewnętrznej [3,5]. Wypustki dendrytyczne melanopsynowych komórek zwojowych nakładają się na siebie i tworzą gęstą sieć obejmującą cały obszar siatkówki. Fotorecepcyjne drzewo dendrytyczne pojedynczej ipRGC pokrywa obszar około  $500 \mu\text{m}^2$ , podczas gdy powierzchnia zajmowana przez światłoczuły segment zewnętrzny pręcika lub czopka to około  $1 \mu\text{m}^2$  [5]. Dendryty komórek zwojowych zawierających melanopsynę docierają do warstwy splotowatej wewnętrznej oraz, w znacznie mniejszym stopniu, do warstwy jądrowej wewnętrznej [3,5,11,26,28]. W obrębie warstwy splotowatej wewnętrznej dendryty tych komórek są położone postsynaptycznie w stosunku do zakończeń komórek dwubiegunowych i amakrynowych, co wskazuje na możliwość modulacji funkcji ipRGCs przez sygnały pochodzenia pręcikowego bądź czopkowego [3].

U ssaków komórki zwojowe zawierające melanopsynę [5,11,26,28,43] wysyłają swoje aksony do :

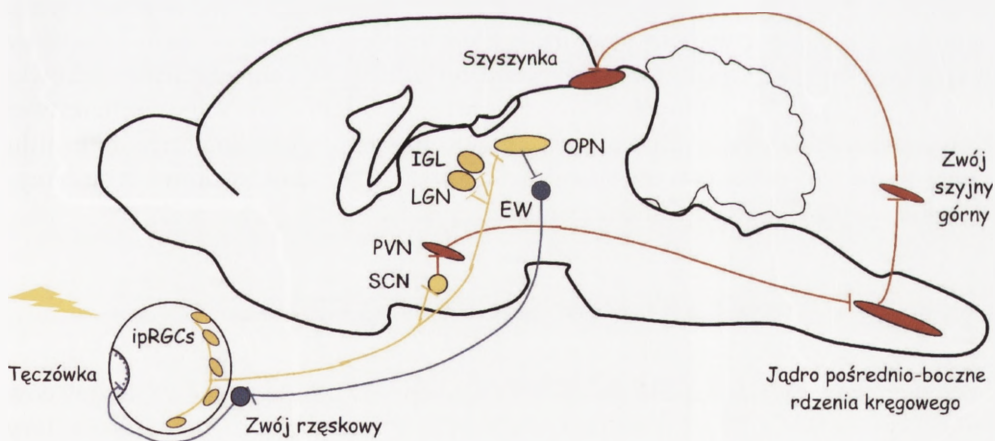
(1) jąder nadskrzyżowaniowych przedniej części podwzgórza (ang. *suprachiasmatic nuclei*; SCN) – struktury uważanej za miejsce głównego zegara biologicznego ssaków;



- (2) kompleksu ciała kolankowatego bocznego – głównie do listka ciała kolankowatego bocznego (ang. *intergeniculate leaflet*; IGL), który uczestniczy w modulacji rytmów okołodobowych;
- (3) przedpokrywowego jądra oliwki (ang. *olivary pretectum nucleus*; OPN), odpowiedzialnego za odruch zwięzania źrenicy pod wpływem światła;
- (4) brzuszno-bocznego jądra przedwzrokowego (ang. *ventrolateral preoptic nucleus*; VLPO) – struktury zaangażowanej w kontrolę rytmu sen-czuwanie;
- (5) brzusznej części obszaru okołokomorowego (ang. *ventral subparaventricular zone*; vSPZ) – rejonu mózgu uczestniczącego w kompleksowej regulacji rytmów okołodobowych. U gryzoni obszar ten najprawdopodobniej odgrywa zasadniczą rolę w procesie hamowania przez światło nocnej aktywności ruchowej (tzw. *negative masking*).

## DOBOWE/OKOŁODOBOWE ZMIANY EKSPRESJI MELANOPSYNY

W siatkówce szczura stopień ekspresji melanopsyny zmienia się rytmicznie w ciągu doby [58,59]. U zwierząt przebywających w cyklicznie zmieniających się warunkach oświetlenia (12 godz. światła : 12 godz. ciemności) najwyższy poziom mRNA dla



RYCINA 3. Światłoczułe komórki zwojowe zawierające melanopsynę (ipRGCs) wysyłają swoje wypustki aksonu do ośrodków kontrolujących rytmy okołodobowe, tj. jąder nadskrzyżowaniowych przedniej części podwzgórza (SCN) i do kompleksu ciała kolankowatego bocznego (jądra ciała kolankowatego bocznego – LGN oraz listka ciała kolankowatego bocznego – IGL), a także do przedpokrywowego jądra oliwki (OPN), które odpowiada za odruch zwięzania źrenicy. Struktury te zaznaczone zostały na schemacie kolorem żółtym. Chronobiologiczny sygnał świetlny z SCN jest przesyłany do szyszynki szlakiem wieloneuronalnym zaznaczonym na kolor czerwony; PVN (ang. *paraventricular nucleus*) – jądro przykomorowe podwzgórza. Szlak neuronalny kontrolujący proces zwięzania źrenicy, w skład którego wchodzi OPN, jądro Edingera-Westphala (EW), zwoj rzęskowy, przed- i zazwojowe włókna przywspółczulne oraz tęczówka, został zaznaczony kolorem niebieskim (wg [5] zmodyfikowano)

melanopsyny zaobserwowano pod koniec fazy jasnej i na początku fazy ciemnej cyklu, a najniższy pod koniec fazy ciemnej i w pierwszej połowie fazy jasnej. Z kolei immunoreaktywność melanopsynowa, odzwierciedlająca poziom białka, była najwyższa w połowie fazy ciemnej, a najniższa w połowie fazy jasnej. Rytmiczne zmiany ekspresji melanopsyny utrzymywały się w siatkówkach szczurów przebywających w warunkach stałej ciemności, co wskazuje, że jest to rytm okołodobowy. Degeneracja pręcików i czopków (badania na szczurach RCS/N-*rdy*<sup>-</sup>) pociągała za sobą dramatyczny (>90%) spadek poziomów mRNA dla melanopsyny i immunoreaktywności melanopsynowej oraz zanik rytmicznych zmian w ekspresji melanopsyny [59]. Z kolei chemiczne zniszczenie neuronów siatkówkowych, których perikariony tworzą warstwę jądrową wewnętrzną, prowadziło do zmniejszenia amplitudy zmian poziomów mRNA dla melanopsyny w siatkówkach szczurów trzymanyh w cyklicznie zmieniających się warunkach oświetlenia, a także do zaniku okołodobowego rytmu mRNA [58]. Przypuszcza się, że w regulacji ekspresji melanopsyny (a także neuropeptydu PACAP, który współwystępuje z melanopsyną w światłoczułych komórkach zwojowych) w siatkówce szczura istotną rolę odgrywają z jednej strony klasyczne fotoreceptory (pręciki i czopki), a z drugiej – siatkówkowe obwody neuronalne. Sugeruje się ponadto znaczący udział dopaminergicznych komórek amakrynowych i receptorów D<sub>2</sub>-dopaminowych (znajdujących się na ipRGCs) w kontroli rytmicznych zmian poziomów melanopsyny w siatkówce szczura [58].

W siatkówce i szyszynce kury poziomy mRNA dla melanopsyny zmieniają się w rytmach okołodobowych o przeciwstawnych fazach. Na początku fazy jasnej w siatkówce obserwowano najwyższą ekspresję melanopsyny, natomiast w szyszynce najniższą. Z kolei w czwartej godzinie fazy ciemnej poziomy mRNA dla melanopsyny w siatkówce były najniższe, a w szyszynce najwyższe [9]. W obrębie warstw siatkówki wyższe „dzienne” poziomy mRNA stwierdzono w RPE i w warstwie jądrowej wewnętrznej, dobowy profil zmian w fotoreceptorach był analogiczny do profilu szyszynkowego, a ekspresja melanopsyny w warstwie komórek zwojowych utrzymywała się na zbliżonym poziomie w ciągu doby [9].

## SZLAKI TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Scharakteryzowane dotychczas światłoczułe opsyny bezkręgowców i kręgowców należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G i jako chromofory wykorzystują 11-*cis*-retinal lub jego homolog [27,35,50]. Pochłonięcie fotonu światła wywołuje konwersję 11-*cis*-retinalu do całkowicie-*trans*-retinalu, co pociąga za sobą zmianę konformacji przestrzennej opsyny, a następnie aktywację białka G i odpowiedniego szlaku transdukcji sygnału. U kręgowców opsyny „współpracują” z wrażliwą na toksynę krztuśca transducyną (G<sub>t</sub>), natomiast u bezkręgowców – z białkami G<sub>q</sub>, które nie są wrażliwe na toksynę krztuśca [27,35,50]. Warunkiem niezbędnym do odbudowy zdolności barwnika wzrokowego do ponownej fotodetekcji jest regeneracja chromoforu. U kręgowców po odłączeniu całkowicie-*trans*-retinalu od opsyny, w złożonym,



wieloetapowym procesie zachodzącym w RPE dochodzi do przekształcenia całkowicie-*trans*-retinalu do 11-*cis*-retinalu [35]. Z kolei opsyny bezkręgowców wykorzystują energię z pochłoniętych fotonów światła do izomeryzacji całkowicie-*trans*-retinalu, a w procesie tym uczestniczy arestyna [33]. Opsyny bezkręgowców działają zatem także jako fotoizomeryzy.

Dla zrozumienia roli fizjologicznej melanopsyny istotne było uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

- (1) jakie zmiany elektrofizjologiczne zachodzą pod wpływem światła w komórkach zawierających melanopsynę,
- (2) jaki chromofor jest niezbędny do fotodetekcyjnej roli melanopsyny,
- (3) jakiego typu białko G jest aktywowane przez melanopsynę,
- (4) jaki szlak/szlaki transdukcji sygnału są uruchamiane w wyniku fotodetekcji światła przez melanopsynę,
- (5) czy melanopsyna, poprzez analogię z opsynami bezkręgowców, może pełnić rolę fotoizomeryzy.

Badania przeprowadzone na oocytach *Xenopus laevis* [47] i dwóch liniach komórkowych, Neuro-2a [41] i HEK293 [54], w których dokonano ekspresji cDNA kodującego melanopsynę, pozwoliły sformułować hipotezę, w jaki sposób pracują komórki melanopsynowe. Po pierwsze udowodniono, że komórki zawierające melanopsynę są bezpośrednio światłoczułe. Pod wpływem ekspozycji na światło dochodzi w nich do opóźnionej, ale jednocześnie długo utrzymującej się depolaryzacji błony komórkowej<sup>2</sup>. Analiza spektralna wskazuje, że efekt taki wywiera światło o długości fali około 480 nm [47,52]. Należy podkreślić, że światło o takiej długości fali aktywuje ipRGCs [5]. Warunkiem niezbędnym do detekcji fotonów światła przez melanopsynę jest obecność chromoforu – 11-*cis*-retinalu (bądź jego analogu 9-*cis*-retinalu)[19,30,47]. Melanopsyna zachowuje zdolność do fotodetekcji również w obecności całkowicie-*trans*-retinalu. Sugeruje to, że podobnie jak opsyny bezkręgowców może ona pełnić podwójną rolę – fotopigmentu i fotoizomeryzy retinalu. Przebiegający przy udziale melanopsyny proces fotoizomeryzacji całkowicie-*trans*-retinalu prawdopodobnie zależy od arestyny [47]. Badania przeprowadzone na genetycznie zmodyfikowanych myszach pozbawionych genu kodującego białko odpowiedzialne za regenerację retinalu w komórkach RPE (*rrpr65<sup>-/-</sup>*), u których analizowano wywołane przez światło zmiany szerokości źrenicy (badania behawioralne) oraz zmiany potencjału błony komórkowej (badania typu *current clamp* i *voltage clamp* pojedynczych komórek zwojowych siatkówki), stanowią dowód potwierdzający słuszność hipotezy, że melanopsyna występująca w ipRGCs jest zarówno barwnikiem wzrokowym jak i fotoizomeryzą [19].

Przypuszcza się, że pochłonięcie fotonów światła przez kompleks melanopsyna – 11-*cis*-retinal prowadzi do aktywacji białka  $G_q/G_{11}$  z następującą stymulacją fosfolipazy C (PLC) i wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów wapniowych ( $[Ca^{2+}]_i$ ), wywołującym tzw. falę wapniową [41,47,54]. Do tej pory nie wyjaśniono do

<sup>2</sup>Pochłonięcie fotonów światła przez opsyny pręcików i czopków prowadzi do bardzo szybkiej i krótkotrwałej hiperpolaryzacji błony komórkowej, będącej wynikiem zamknięcia zależnych od cGMP kanałów kationowych w segmentach zewnętrznych komórek [35,50].

TABELA 1. Różnice pomiędzy klasycznymi fotoreceptorami (pręcikami i czopkami) a światłoczułymi komórkami zwojowymi (ipRGCs) w siatkówce ssaków

Lokalizacja ciała komórki	Pręciki i czopki	Światłoczułe komórki zwojowe
Zakończenia aksonów docierają do	Warstwa jądrowa zewnętrzna	Głównie warstwa komórek zwojowych, rzadko warstwa jądrowa wewnętrzna
Liczba komórek w dojrzałej siatkówce (dane dla człowieka)	Komórki dwubiegunowe i komórki poziome siatkówki	Mózg: SCN, OPN, LGN, IGL, VLPO, obszar okobokomorowy
Pole recepcyjne	Okolo 3.000.000	Okolo 3000
Elementy fotorecepcyjne komórki	Małe	Rozległe
Barwnik wzrokowy	Segmenty zewnętrzne	Penkaron, dendryty, akson (?)
$\lambda_{\text{maks}}$ (nm; dane dla siatkówki człowieka)	Pręciki – rodopsyna, czopki – opsyny czopkowe	Melanopsyna
Odpowiedź na światło	Pręciki – 497; czopki: SWS – 414, MWS – 530; LWS – 560	480
Potencjał czynnościowy	Szybka, przejściowa ( <i>transient</i> ) hiperpolaryzacja	Wolna, utrzymująca się depolaryzacja
Szlak transdukcji sygnału po absorpcji fotonów światła	Nie	Tak
	Białko $G_i \rightarrow PDE \rightarrow cGMP \rightarrow Ca^{2+} \downarrow$	Białko $G_q/G_{11} \rightarrow PLC \rightarrow Ca^{2+} \uparrow$

SCN – jądro nadskrzyżowanie podwzgórza, OPN – przedpokrywowe jądro oliwki; LGN – jądro ciała kolankowatego bocznego, IGL – listek ciała kolankowatego bocznego, VLPO – brzuszoboczne jądro przedwzrokowe; PDE – fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów; PLC – fosfolipaza C;  $\uparrow$  – wzrost;  $\downarrow$  – spadek



końca, w jaki sposób aktywacja PLC uruchamia falę wapniową w komórce zawierającej melanopsynę. Prawdopodobnie w procesie tym uczestniczy inozytolo-1,4,5-trisfosforan ( $IP_3$ ), powstały w wyniku działania PLC, który uruchamia wewnątrzkomórkowe magazyny  $Ca^{2+}$  i podnosi stężenie  $[Ca^{2+}]_i$  w komórce [32]. Sugeruje się ponadto, że w powstawaniu fali wapniowej istotną rolę odgrywają przepuszczalne dla  $Ca^{2+}$ , nieselektywne kanały kationowe TRPC (ang. *transient receptor potential cation channels*) [47,54]. Budowa i funkcja kanałów TRPC jest zbliżona do kanałów typu Trp i Trpl, które występują w fotoreceptorach muszki owocowej i uczestniczą w procesie fototransdukcji [42].

Najnowsze badania wykazały, że podobnie jak w przypadku klasycznych fotoreceptorów [14,35], wrażliwość ipRGCs na światło ulega plastycznym zmianom w odpowiedzi na utrzymujące się stałe warunki oświetlenia [71]. W tzw. procesie adaptacji do światła, w czasie ekspozycji na światło o jednakowym natężeniu promieniowania dochodzi do stopniowego zmniejszania odpowiedzi elektrofizjologicznej komórek, czyli do ich desensytyzacji. Nowe bodźce świetlne, o wyższym natężeniu promieniowania niż wcześniejsze „tło”, do którego zaadaptowały się komórki, będą indukowały odpowiedzi o wzrastającej amplitudzie, dochodzi wówczas do resensytyzacji ipRGCs. Z kolei proces adaptacji do ciemności polega na stopniowej, trwającej nawet kilka godzin, pełnej odbudowie fotowrażliwości ipRGCs. Proces ten obserwuje się w komórkach siatkówek, które po długotrwałej ekspozycji na światło umieszczono w ciemności [71]. Przypuszcza się, że adaptacyjne zmiany ipRGCs do panujących warunków oświetlenia są najprawdopodobniej wynikiem zmian w szlaku przepływu sygnału z melanopsyny na kanały kationowe, a nie zmian w pracy samych kanałów. Fizjologiczne znaczenie zjawiska plastyczności ipRGCs jest dotychczas nieznanne. Być może zdolność ipRGCs do zmian adaptacyjnych w odpowiedzi na „historię” oświetlenia siatkówki pozwala im rozpoznawać i kodować zmiany w natężeniu oświetlenia w bardzo szerokim zakresie charakterystycznym dla zmian zachodzących w ciągu dnia (np. światło o wschodzie słońca – światło w południe – światło o zachodzie słońca) oraz o różnych porach roku. Umożliwiłoby to kluczowy udział tych komórek w regulacji zależnych od światła procesów chronobiologicznych przebiegających na długiej przestrzeni czasu (rytmy okołodobowe, rytmy sezonowe) [71].

## ZMIANY EKSPRESJI MELANOPSYNY W PRZEBIEGU ROZWOJU OSOBNICZEGO

Oprócz systemu transdukcji sygnału i zdolności do fotoizomeryzacji chromoforu, kolejną cechą, która odróżnia melanopsynę od klasycznych opsyn pręcików i czopków, są zmiany w stopniu ekspresji tego białka w przebiegu rozwoju siatkówki. Melanopsyna pojawia się w rozwoju embrionalnym bardzo wcześnie, znacznie wyprzedzając rozwój pręcików i czopków (a następnie specyficznych dla tych fotoreceptorów opsyn) oraz nerwu wzrokowego. Ekspresję melanopsyny, podobnie jak i innych opsyn, które nie są związane

z pręcikami i czopkami: peropsyny, encefalopsyny i RGR-opsyny (ang. *retinal G-protein coupled receptor opsin*) [34], wykryto już u 9-tygodniowych płodów ludzkich [65].

Badania morfologiczne i elektrofizjologiczne dowodzą, że sygnalizacja wzrokowa w oku myszy pojawia się dopiero w dziesiątym dniu po urodzeniu (P10) [2,55]. U myszy pręciki i czopki powstają w czasie rozwoju embrionalnego, ale dojrzewają anatomicznie i funkcjonalnie dopiero w okresie postnatalnym [60,65]. Różnicowanie czopków opisano u 10-dniowych zarodków (E10), natomiast ekspresję genu kodującego opsynę UVS/V5 w P1, a opsynę LWS – w P7. Z kolei różnicowanie pręcików w siatkówce myszy zachodzi w E12, ale ekspresja genu kodującego opsynę pręcikową jest wykrywalna dopiero w P5. Ponadto, błony segmentów zewnętrznych pręcików i czopków pojawiają się po raz pierwszy w P4-P6 i dojrzewają w pełni w P20. W okresie pomiędzy P10 i P20 obserwuje się dojrzewanie i akumulację w siatkówce myszy estru 11-*cis*-retinyli – prekursora 11-*cis*-retinalu. Powyższe zmiany rozwojowe korelują w czasie z pojawieniem się odpowiedzi ON/OFF komórek zwojowych siatkówki myszy na światło.

Ekspresję melanopsyny w siatkówce myszy stwierdzono już w E10, tj. w tym samym czasie, kiedy w rozwoju embrionalnym tego gatunku pojawiają się komórki zwojowe siatkówki [60]. W siatkówkach wyizolowanych od noworodków mysich gęstość komórek zwojowych zawierających melanopsynę wynosiła 182/mm<sup>2</sup>, u myszy 4-dniowych – 226/mm<sup>2</sup>, natomiast u myszy 14-dniowych – tylko 63/mm<sup>2</sup> [60]. Zmiany liczby komórek zwojowych zawierających melanopsynę opisano także w przebiegu rozwoju siatkówki szczura [13]. Słaby sygnał, obecny w warstwie neuroblastycznej wewnętrznej, wskazujący na immunoreaktywność melanopsynową zarejestrowano najwcześniej w E18. Następnie liczba komórek melanopsynowych wzrastała aż do drugiego tygodnia życia. Komórki te występowały w warstwie komórek zwojowych. Należy podkreślić, że u szczurów w wieku od 1 do 12 dni ekspozycja na światło prowadziła do ekspresji c-Fos wyłącznie w tych komórkach zwojowych siatkówki, które zawierały melanopsynę [13,22,23].

W kontekście potencjalnej roli fizjologicznej melanopsyny i ipRGCs za niezwykle ważne można uznać wyniki badań nad rozwojowymi zmianami w elektrofizjologicznej odpowiedzi komórek zwojowych na światło. Badania te przeprowadzono na myszach dzikich i myszach z knockoutem genu kodującego melanopsynę (*Opn4<sup>-/-</sup>*) [60]. W siatkówkach pobranych od myszy dzikich w wieku P0-P1 w 13,7% komórek zwojowych pod wpływem światła (o długości fali 470 nm) obserwowano zmiany w intensywności fluorescencji FURA-2 odzwierciedlające wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  (fałę wapniową). Zdecydowana większość (93%) zarejestrowanych zmian utrzymywała się do końca ekspozycji na światło. W wieku P4-P5 tylko 5,4% komórek zwojowych siatkówki odpowiadało fałą wapniową na bodziec świetlny, przy czym około jednej czwartej tych odpowiedzi miało charakter przejściowy (szybki wzrost, a następnie spadek  $[Ca^{2+}]_i$ ). Wyeliminowanie potencjalnych sygnałów z pręcików i czopków (inkubacja siatkówek w obecności antagonistów glutaminergicznych receptorów jonotropowych i agonisty glutaminergicznych receptorów metabotropowych) nie zmieniało liczby komórek zwojowych odpowiadających na światło. Stanowi to dowód na to, że w siatkówce myszy występuje subpopulacja komórek zwojowych charakteryzujących się zdolnością do pochłaniania fotonów światła, a zatem bezpośrednią wrażliwością na światło [60]. Ponieważ w



siatkówkach pobranych od 4-dniowych myszy *Opn4<sup>-/-</sup>* pod wpływem światła nie rejestrowano zmian w  $[Ca^{2+}]_i$ , sądzi się, że światłoczułe komórki zwojowe zawierają melanopsynę. W tym miejscu należy podkreślić, że u 4-dniowych myszy dzikich, ale nie u myszy *Opn4<sup>-/-</sup>*, godzinna ekspozycja na światło indukuje ekspresję c-Fos w SCN [60]. U dorosłych, genetycznie zmodyfikowanych myszy (*rdrd/cl*), u których w wyniku mutacji doszło do zaniku pręcików i czopków, tylko 2,7% neuronów warstwy zwojowej siatkówki w odpowiedzi na światło wykazywało wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  [60].

Badania elektrofizjologiczne przeprowadzone na wyizolowanych siatkówkach myszy [68] wykazały, że w tkankach pobranych od zwierząt 8-dniowych występują trzy rodzaje światłoczułych komórek zwojowych zawierających melanopsynę. Komórki typu I (72% całej populacji ipRGCs) charakteryzują się długą, kilkusekundową latencją odpowiedzi na światło monochromatyczne ( $\lambda_{maks} = 480$  nm; subsaturacyjne natężenie promieniowania) i szybkim zanikiem odpowiedzi elektrofizjologicznej po wyłączeniu światła. Komórki typu II (15%) odpowiadają na bodziec świetlny z kilkusekundowym opóźnieniem, a ich wyładowania elektryczne powoli zanikają po wyłączeniu światła. Komórki typu III (13%) wykazują natomiast bardzo krótki czas latencji i najdłużej utrzymującą się odpowiedź. Wrażliwość na światło komórek typu II była 10-krotnie niższa od wrażliwości komórek typu I i III. Z kolei w siatkówkach myszy 5-tygodniowych występują tylko dwie klasy ipRGCs, którym ze względu na podobieństwa w zapisie odpowiedzi elektrofizjologicznych na światło nadano nazwy „dorosły” typ II i „dorosły” typ III. Przypuszcza się, że w czasie rozwoju siatkówki najprawdopodobniej dochodzi do przekształcenia się komórek typu I w komórki typu II [68].

Na podstawie zgromadzonych danych doświadczalnych przypuszcza się, że w późnym okresie embrionalnego rozwoju siatkówki najprawdopodobniej dochodzi do nadprodukcji światłoczułych komórek zwojowych zawierających melanopsynę, po czym po urodzeniu następuje faza szybkiego ich obumierania, trwająca kilka dni [13,23,60,63,68]. W ciągu dwóch pierwszych tygodni życia prawdopodobnie dochodzi także do intensywnego rozwoju, a następnie zmian morfologicznych drzewa dendrytycznego ipRGCs [13,68]. Od dnia narodzin, czyli zanim funkcjonalnie dojrzeją pręciki i czopki, światło aktywuje grupę komórek zwojowych tworzących szlak siatkówkowo-podwzgórzowy. Komórki te zawierają melanopsynę oraz PACAP; stanowią one podstawowy element odbioru tzw. niewzrokowej informacji świetlnej. W okresie dojrzewania siatkówki, kiedy zmniejsza się populacja komórek zwojowych zawierających melanopsynę, następuje wykształcenie się systemu odbioru informacji świetlnej opartego na fotodetekcji pręcików i czopków. Przypuszcza się, że klasyczne fotoreceptory stopniowo włączają się w system fotodetekcji niewzrokowej i dochodzi do wzajemnej integracji tych dwóch szlaków fotoreceptyjnych – wzrokowego i niewzrokowego [3,8,60,63]. Spadek liczby melanopsynowych ipRGCs obserwuje się także u zwierząt starych [59,61]. Uważa się, że w patomechanizmie zaniku ipRGCs istotną rolę może odgrywać redukcja, a następnie brak modulujących sygnałów ze strony pręcików i czopków. U starych myszy *rdrd/cl* liczba komórek zwojowych zawierających melanopsynę, w których obserwowano ekspresję c-Fos pod wpływem światła, była znamienne niższa niż w siatkówkach myszy dzikich w tym samym wieku [61].

## ROLA FIZJOLOGICZNA

Komórki zawierające melanopsynę spełniają wiele kryteriów stawianych potencjalnym kandydatom na fotoreceptory okołodobowe. W przeciwieństwie do klasycznych fotoreceptorów, komórki zawierające melanopsynę (ipRGCs bądź komórki, w których dokonano ekspresji genu *Opn4*) są najbardziej wrażliwe na fale o długości około 480 nm (promieniowanie w tym zakresie wywiera najsilniejsze działanie na układ okołodobowy kręgowców i odruch zwężania źrenicy) oraz kodują energię promieniowania świetlnego i rejestrują zmiany w natężeniu promieniowania zachodzące w ciągu dłuższego czasu [29,38,54]. Obecność melanopsyny w obrębie rozbudowanego drzewa dendrytycznego ipRGCs pozwala na zbieranie informacji świetlnej z obszaru całej siatkówki [28]. Aksony ipRGCs docierają do struktur mózgowych odpowiedzialnych za wytwarzanie i regulację rytmów okołodobowych (SCN, IGL, jąder przedwzrokowych) oraz do OPN – struktury odpowiedzialnej za odruch zwężania źrenicy pod wpływem światła [5,11,20,24,26,28]. Myszy pozbawione genu kodującego melanopsynę (*Opn4<sup>-/-</sup>*), pomimo prawidłowego rozwoju komórek zwojowych siatkówki, wykazywały znamienne osłabione następujące odpowiedzi behawioralne: zwężenie źrenicy pod wpływem światła, indukowane przez światło przesuwanie faz okołodobowego rytmu aktywności ruchowej w warunkach kilkudniowej adaptacji do ciemności, wydłużanie cyklu rytmu aktywności ruchowej w warunkach kilkudniowej adaptacji do światła [29,38-40,44,48,57]. Całkowity zanik tzw. niewzrokowych odpowiedzi na światło obserwowano u myszy homozygotycznych z potrójnym knockoutem (*Opn4<sup>-/-</sup>, Gnat1<sup>-/-</sup>, Cnga3<sup>-/-</sup>*), a więc u zwierząt pozbawionych melanopsyny oraz funkcjonalnej fototransdukcji pręcikowej (knockout genu kodującego podjednostkę  $\alpha$  transducyny-1) i fototransdukcji czopkowej (knockout genu kodującego podjednostkę 3 kanału A zależnego od cGMP) [29]. Ponadto, myszy *math5<sup>-/-</sup>*, u których w wyniku mutacji nie wykształcają się komórki zwojowe siatkówki i szlak siatkówkowo-podwzgórzowy (dochodzi zatem do genetycznego „odnerwienia” SCN), nie wykazywały synchronizacji rytmu aktywności ruchowej z warunkami oświetlenia środowiska [70]. Powyższe dane, w połączeniu z sugestiami na temat wzajemnych powiązań funkcjonalnych pomiędzy światłoczułymi komórkami zwojowymi zawierającymi melanopsynę a neuronami siatkówkowymi przenoszącymi informacje od pręcików i czopków, pozwalają przypuszczać, że do zachowania prawidłowych odpowiedzi niewzrokowych konieczna jest obecność w oku zarówno fotoreceptorów okołodobowych (ipRGCs), jak i klasycznych fotoreceptorów. Przypuszcza się także, że sygnały wzrokowe mogą być modulowane przez światłoczułe komórki zwojowe [3,11,15,61].

Fakt, że komórki zwojowe zawierające melanopsynę rozwijają się wcześniej i są funkcjonalnie dojrzałe już w dniu narodzin [63], czyli znacznie wcześniej niż klasyczne fotoreceptory [46], podkreśla jak duże znaczenie odgrywa u ssaków synchronizacja rytmów okołodobowych z warunkami oświetlenia środowiska. System „widzenia chronobiologicznego” pozwala na szybkie przestawienie się kompleksu zegara biologicznego z odbioru informacji o porze dnia zakodowanych w sygnałach wytwarzanych przez organizm matki (głównie w cząsteczkach melatoniny, która przechodzi przez



łożysko i działa na receptory melatoninowe zlokalizowane w SCN płodu [64,66]) na odbiór sygnałów powstających pod wpływem światła w oku noworodka [63]. Elektrofizjologiczna aktywność komórek zwojowych zawierających melanosynę w późnym okresie embrionalnym (spontaniczna) i we wczesnym okresie postnatalnym (zarówno spontaniczna jak i indukowana przez światło) sugeruje ponadto, że mogą one odgrywać istotną rolę w plastycznym dojrzewaniu struktur ośrodkowego układu nerwowego zaangażowanych w wytwarzanie i kontrolę rytmów okołodobowych [63].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BAILEY MJ, CASSONE VM. Melanopsin expression in the chick retina and pineal gland. *Mol Brain Res* 2005; **134**: 345–348.
- [2] BAKALL B, MARNORSTEIN LY, HOPPE G, PEACHEY NS, WADELIUS C, MARMORSTEIN AD. Expression and localization of bestrophin during normal mouse development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 3622–3628.
- [3] BELENKY MA, SMERASKI CA, PROVENCIO I, SOLLARS PJ, PICKARD GE. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol* 2003; **460**: 380–393.
- [4] BELLINGHAM J, WHITEMORE D, PHILP AR, WELLS DJ, FOSTER RG. Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localization and phylogenetic position. *Mol Brain Res* 2002; **107**: 128–136.
- [5] BERSON DM. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 2003; **26**: 314–320.
- [6] BERSON DM, DUNN FA, TAKAO M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; **295**: 1070–1073.
- [7] BRAINARD GC, HANIFIN JP. Photons, clocks, and consciousness. *J Biol Rhythms* 2005; **20**: 314–325.
- [8] BULLOUGH JD, FIGUEIRO MG, POSSIDENTE BP, PARSONS RH, REA MS. Additivity in murine circadian phototransduction. *Zool Sci* 2005; **22**: 223–227.
- [9] CHAURASIA SS, ROLLAG MD, JIANG G, HAYES WP, HAQUE R, NATESAN A, ZATZ M, TOSINI G, LIU C, KORF HW, IUOVONE PM, PROVENCIO I. Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (*Opn4*): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *J Neurochem* 2005; **92**: 158–170.
- [10] CZEISLER CA, SHANAHAN TL, KLERMAN EB, MARTENS H, BROTMAN DJ, EMENS JS, KLEIN T, RIZZO JF III. Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med* 1995; **332**: 6–11.
- [11] DACEY DM, LIAO H-S, PETERSON B, ROBINSON FR, SMITH VC, POKORNY J, YAU K-W, GAMLIN PD. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 2005; **433**: 749–754.
- [12] DRIVENES O, SOVIKNES AM, EBBESSON LO, FJOASE A, SEO HC, HELVIK JV. Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain. *J Comp Neurol* 2003; **456**: 84–93.
- [13] FAHRENKRUG J, NIELSEN HS, HANNIBAL J. Expression of melanopsin during development of the rat retina. *Neuroreport* 2004; **15**: 781–784.
- [14] FAIN GL, MATTHEWS HR, CORNWALL MC, KOUTALOS Y. Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 2001; **81**: 117–151.
- [15] FOSTER RG. Bright blue times. *Nature* 2005; **433**: 698–699.
- [16] FOSTER RG. Keeping an eye on the time. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 1286–1298.
- [17] FREEDMAN MS, LUCAS RJ, SONI B, VON SCHANTZ M, MUÑOZ M, DAVID-GRAY Z, FOSTER RG. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; **284**: 502–504.
- [18] FU Y, LIAO HW, DO MT, YAU K-W. Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 2005; **15**: 415–422.

- [19] FU Y, ZHONG H, WANG M-HH, LUO D-G, LIAO H-WM, MAEDA H, HATTAR S, FRISHMAN LJ, YAU K-W. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 10339–10344.
- [20] GOOLEY JJ, LU J, FISCHER D, SAPER CB. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 2003; **23**: 7093–7106.
- [21] HANNIBAL J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tiss Res* 2002; **309**: 73–88.
- [22] HANNIBAL J, FAHRENKRUG J. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 2004; **15**: 2317–2320.
- [23] HANNIBAL J, GEORG B, HINDERSSON P, FAHRENKRUG J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci* 2005; **27**: 147–155.
- [24] HANNIBAL J, HINDERSSON P, KNUDSEN SM, GEORG B, FAHRENKRUG J. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* 2002; **22**: RC191 (1–7).
- [25] HANNIBAL J, HINDERSSON P, NEVO E, FAHRENKRUG J. The circadian photopigment melanopsin is expressed in the blind subterranean mole rat, Spalax. *Neuroreport* 2002; **13**: 1411–1414.
- [26] HANNIBAL J, HINDERSSON P, ØSTERGAARD JM, GEORG B, HEEGAARD S, LARSEN PJ, FAHRENKRUG J. Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 4202–4209.
- [27] HARDIE RC, RAGHU P. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 2001; **413**: 186–193.
- [28] HATTAR S, LIAO H-W, TAKAO M, BERSON DM, YAU K-W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; **295**: 1065–1070.
- [29] HATTAR S, LUCAS RJ, MROSOVSKY N, THOMPSON S, DOUGLAS RH, HANKINS MW, LEMI J, BIEL M, HOFMANN F, FOSTER RG, YAU K-W. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 2003; **424**: 76–81.
- [30] HE S, DONG W, DENG Q, WENG S, SUN W. Seeing more clearly: recent advances in understanding retinal circuitry. *Science* 2003; **302**: 408–411.
- [31] HERMANN R, POPPE L, PILBAK S, BODEN S, MAURER J, WEBER S, LERCHL A. Predicted 3D-structure of melanopsin, the non-rod, non-cone photopigment of the mammalian circadian clock, from Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Neurosci Lett* 2005; **376**: 76–80.
- [32] ISOLDI MC, ROLLAG MD, DE LAURO CASTRUCCI AM, PROVENCIO I. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 1217–1221.
- [33] KISELEV A, SUBRAMANIAM S. Studies of Rh1 metarhodopsin stabilization in wild-type *Drosophila* and in mutants lacking one or both arrestins. *Biochemistry* 1997; **36**: 2188–2196.
- [34] KUMBALASIRI T, PROVENCIO I. Melanopsin and other novel mammalian opsins. *Exp Eye Res* 2005; **81**: 368–375.
- [35] LAMB TD, PUGH EN Jr. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res* 2004; **23**: 307–380.
- [36] LOCKLEY SW, SKENE DJ, ARENDT, TABANDEH H, BIRD AC, DEFRAE R. Relationship between melatonin rhythms and visual loss in blind. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3763–3770.
- [37] LUCAS RJ, FOSTER RG. Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin. *Endocrinol* 1999; **140**: 1520–1524.
- [38] LUCAS RJ, DOUGLAS RH, FOSTER RG. Characterization of ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci* 2001; **4**: 621–626.
- [39] LUCAS RJ, FREEDMAN MS, MUÑOZ M, GARCIA-FERNANDEZ J-M, FOSTER RG. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; **284**: 505–507.
- [40] LUCAS RJ, HATTAR S, TAKAO M, BERSON DM, FOSTER RG, YAU K-W. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 2003; **299**: 245–247.
- [41] MELYAN Z, TARTTELIN EE, LUCAS RJ, HANKINS MW. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoreceptive. *Nature* 2005; **433**: 741–745.
- [42] MONTELL C. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol* 2005; **567**: 45–51.
- [43] MORIN LP, BLANCHARD JH, PROVENCIO I. Retinal ganglion cell projections to the hamster supra-chiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 2003; **465**: 401–416.
- [44] MROSOVSKY N, HATTAR S. Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int* 2003; **20**: 989–999.



- [45] MROSOVSKY N, LUCAS RJ, FOSTER RG. Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones. *J Biol Rhythms* 2001; **16**: 585–588.
- [46] MUÑOZ-LLAMOSAS M, HUERTA JJ, CERNUTA-CERNUTA R, GARCIA-FERNANDEZ JM. Ontogeny of photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; **120**: 1–6.
- [47] PANDA S, NAYAK SK, CAMPO B, WALKER JR, HOGENESCH JB, JEGLA T. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 2005; **307**: 600–604.
- [48] PANDA S, PROVENCIO I, TU DC, PIRES SS, ROLLAG MD, CASTRUCCI AM, PLETCHER MT, SATO TK, WILTSHIRE T, ANDAHAZY M, KAY SA, VAN GELDER RN, HOGENESCH JB. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 2003; **301**: 525–527.
- [49] PEIRSON SN, BOVEE-GEURTS PH, LUPI D, JEFFERY G, DE GRIP WJ, FOSTER RG. Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (*Opn4*) in the mouse retinal pigment epithelium. *Mol Brain Res* 2004; **123**: 132–135.
- [50] PEPE IM. Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction. *Prog Retin Eye Res* 2001; **20**: 733–759.
- [51] PROVENCIO I, JIANG G, DE GRIP WJ, HAYES WP, ROLLAG MD. Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 340–345.
- [52] PROVENCIO I, RODRIGUEZ IR, JIANG G, HAYES WP, MOREIRA EF, ROLLAG MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 2000; **20**: 600–605.
- [53] PROVENCIO I, ROLLAG MD, CASTRUCCI AM. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 2002; **415**: 493.
- [54] QIU X, KUMBALASIRI T, CARLSON SM, WONG KY, KRISHA V, PROVENCIO I, BERSON DM. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 2005; **433**: 745–749.
- [55] RATTO GM, ROBINSON DW, YAN B, MC NAUGHTON PA. Development of the light response in neonatal mammalian rods. *Nature* 1991; **351**: 654–657.
- [56] ROLLAG MD, BERSON DM, PROVENCIO I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 2003; **18**: 227–234.
- [57] RUBY NF, BRENNAN TJ, XIE X, CAO V, FRANKEN P, HELLER HC, O'HARA BF. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 2002; **298**: 2211–2216.
- [58] SAKAMOTO K, LIU C, KASAMATSU M, POZDEYEV NV, IUVONE PM, TOSINI G. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 2005; **22**: 3129–3136.
- [59] SAKAMOTO K, LIU C, TOSINI G. Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J Neurosci* 2004; **24**: 9693–9697.
- [60] SEKARAN S, LUPI D, JONES SL, SHEELY CJ, HATTAR S, YAU K-W, LUCAS RJ, FOSTER RG, HANKINS MW. Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol* 2005; **15**: 1099–1107.
- [61] SEMO M, LUPI D, PEIRSON S, BUTLER JS, FOSTER RG. Light-induced *c-fos* in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (*rd/rd cl*) mice. *Eur J Neurosci* 2003; **18**: 3007–3017.
- [62] SEMO N, MUÑOZ-LLAMOSAS M, FOSTER RG, JEFFERY G. Melanopsin (*Opn4*) positive cells in the cat retina are randomly distributed across the ganglion cell layer. *Vis Neurosci* 2005; **22**: 111–116.
- [63] SERNAGOR E. Retinal development: second sight comes first. *Curr Biol* 2005; **15**: R556R–559.
- [64] SERON-FERRE M, TORRES C, PARRAGUEZ VH, VERGARA M, VALLADARES L, FORCELLEDO ML, CONSTANDIL L, VALANZUELA GJ. Perinatal neuroendocrine regulation. Development of the circadian time-keeping system. *Mol Cell Endocrinol* 2002; **186**: 169–173.
- [65] TARTTELIN EE, BELLINGHAM J, BIBB LC, FOSTER RG, HANKINS MW, GREGORY-EVANS K, GREGORY-EVANS CY, WELLS DJ, LUCAS RJ. Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp Eye Res* 2003; **76**: 393–396.
- [66] THOMAS L, DREW JE, ABRAMOVICH DR, WILLIAMS LM. The role of melatonin in the human fetus (review). *Int J Mol Med* 1998; **1**: 539–543.
- [67] TOMONARI S, TAKAGI A, AKAMATSU S, NOJI S, OBUCHI H. A non-canonical photopigment, melanopsin, is expressed in the differentiating ganglion, horizontal, and bipolar cells of the chicken retina. *Dev Dynamics* 2005; **234**: 783–790.
- [68] TU DC, ZHANG D, DEMAS J, SLUTSKY EB, PROVENCIO I, HOLY TE, VAN GELDER RN. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 2005; **48**: 987–999.

- [69] VON SCHANTZ M, PROVENCIO I, FOSTER RG. Recent developments in circadian photoreception: more than meets the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 1605–1607.
- [70] WEE R, CASTRUCCI AM, PROVENCIO I, GAN L, VAN GELDER RN. Loss of photic entrainment and altered free-running circadian rhythms in *math5*<sup>-/-</sup> mice. *J Neurosci* 2002; **22**: 10427–10433.
- [71] WONG KY, DUNN FA, BERSON DM. Photoreceptor adaptation in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 2005; **48**: 1001–1010.

*Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska*

*Otrzymano: 03.01. 2006 r.*

*Przyjęto: 14.03. 2006 r.*

*CBM PAN, 93-232 Łódź, ul. Lodowa 106*

*email: jzawilska@pharm.am.lodz.pl*



## CZYNNIKI DZIAŁAJĄCE HAMUJĄCO NA TLR (RECEPTORY TOLL-PODOBNE)

### THE FACTORS OF NEGATIVE REGULATION OF TLR (TOLL-LIKE RECEPTORS).

Wiesław DEPTUŁA, Paulina NIEDŹWIEDZKA, Beata TOKARZ-DEPTUŁA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii  
Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego

*Streszczenie:* W pracy przedstawiono pięć grup czynników (rozpuszczalne formy TLR, wewnątrzkomórkowe receptory, regulatory transbłonowe oraz czynniki redukujące ekspresję TLR i redukujące efekt TLR) działających hamująco na receptory Toll-podobne (TLR).

*Słowa kluczowe:* TLR, układ odpornościowy.

*Summary:* In the paper five groups of factors (soluble forms of TLRs, intracellular regulators, transmembrane regulators, reduction of TLR expression and reduction of TLR effect) of negative regulation of TLRs (Toll-like receptors) have been described.

*Key words:* TLR, immune system.

## WPROWADZENIE

Odkrycie TLR (*Toll-Like Receptors* – receptory Toll-podobne) było dla współczesnych badaczy, jak pisze O’Neill [23], czymś nie mniej istotnym niż odkrycie dokonane przez Kolumba dla średniowiecznych Europejczyków. Poznanie i sklasyfikowanie ich jako zupełnie nowej klasy receptorów w obrębie PRR (*pathogen recognition receptors*) stworzyło zupełnie nową jakość w immunologii, w tym odporności naturalnej [7,21,23,24,26]. Receptory Toll-podobne swoją nazwę zawdzięczają receptorom Toll u muszki owocowej, u której receptor ten odpowiedzialny jest za grzbietowo-brzuszy rozwój tych owadów oraz odporność przeciwgrzybiczą [7,21,24,26]. U ssaków zafascy-

nowanie tego typu receptorami wzięło swój początek od receptora TLR4, zidentyfikowanego po raz pierwszy przez Medzhitova u człowieka [19]. Obecnie opisano 13 TLR, dla większości których określono odpowiednie ligandy i drogi ich sygnałów wewnątrzkomórkowych [7,21,26]. Wykazano także [7,21,26], że efektywność odpowiedzi układu odpornościowego (UO) związana jest w głównej mierze ze specyficznym wiązaniem się TLR z ligandami zarasków, co powoduje nie tylko przyspieszenie reakcji UO, ale także zwielokrotnienie ich intensywności. Transdukcja sygnału, poprzez TLR, wzmacniającego reakcję elementów UO, wymaga obecności wielu białek, wśród których najważniejsze jest białko adaptorowe MyD88 (*myeloid differentiation 88*) [7,16,21,25,26]. Niepodważalne znaczenie tej proteiny zostało udowodnione u myszy z jej niedoborem, u których zarejestrowano zupełny brak reakcji na stymulację IL-1 i innych cytokin związanych z IL-1R (IL-18) [25]. Ponadto stwierdzono, że mysie makrofagi niemające MyD88 są niewrażliwe na lipopolisacharyd (LPS), peptydoglikan (PGN), lipoproteiny, CpG DNA (*cytosine-phosphate-guanosine DNA*) i flageliny bakteryjne – fundamentalne ligandy dla TLR [25,26]. Transdukcję sygnału, poprzez TLR, warunkują elementy strukturalne MyD88, w tym przede wszystkim domena TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*), a także „domena śmierci” – FADD (*Fas-associated death domain*). Ta ostatnia indukuje apoptozę tylko w drodze zależnej od kaspaz. Wykazano [7,16,21,25,26], że ścieżki sygnałne poprzez receptory Toll-podobne są inicjowane w wyniku dimeryzacji TLR, co powoduje formowanie homodimerów (jak w przypadku TLR4) czy heterodimerów (jak w przypadku TLR2 i TLR1). Dalej droga sygnału pobudzenia prowadzi do interakcji domeny TIR TLR z domeną TIR cząsteczki adaptorowej MyD88 [7,16,21,25,26], poprzez fosforylację kinazy IRAK1 i IRAK4 (*IL-1 receptor-associated kinase*), które z kolei aktywowane są poprzez domenę śmierci FADD MyD88 [7,16,21,25,26]. Następny etap to uruchomienie TRAF6 (*tumour-necrosis factor-receptor-associated factor 6*), który wchodzi w interakcje z kompleksem składającym się z TAK1 (*transforming growth factor-beta-associated kinase*), TAB1 i TAB2 (*TAK-binding proteins*), prowadząc także do fosforylacji tych dwóch ostatnich białek i translokacji TRAF6 i TAB1 do cytozolu [7,16,21,25,26]. Niektórzy autorzy podają [16], że TRAF6 może występować w tym układzie w kompleksie z enzymami wiążącymi ubikwitynę (*ubiquitin-conjugating enzymes*) – UEV1 i UBC13. Dodać należy i to, że aktywacja czynnika TAK1 w cytoplazmie prowadzi do aktywacji kinazy I $\kappa$ B (*IKK-inhibitor of NF- $\kappa$ B kinases*), co w rezultacie, poprzez fosforyzację i degradację, doprowadza do uwolnienia NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) [7,16,21,25,26]. Stan taki jest przyczyną wnikięcia NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego i indukcji ekspresji genów niezbędnych dla cytokin prozapalnych, cząstek kostymulujących oraz antygenów kompleksu zgodności tkankowej (MHC) klasy I i II [7,16,21,25,26]. Inne drogi aktywacji UO poprzez TLR, przebiegające niezależnie od MyD88, powodują, że reakcje te zachodzą w mniejszym natężeniu, są wolniejsze i mniej efektywne, co wykazano u makrofagów z niedoborem MyD88 [7,16,21,25,26].



## CZYNNIKI DZIAŁAJĄCE HAMUJĄCO NA TLR

Do tej pory charakteryzując mechanizm łączenia się poszczególnych TLR między innymi z ligandami zarazków, opisywano i podawano jedynie ich aktywujący wpływ na elementy i reakcje UO [7,16,21,25,26]. Prace z ostatnich miesięcy wskazują także na istnienie czynników negatywnej regulacji, to jest elementów hamująco oddziałujących na reakcję TLR - komórki UO makroorganizmów [16]. Jak dotychczas opisano pięć grup takich czynników i są to: rozpuszczalne formy TLR, wewnątrzkomórkowe receptory, regulatory transbłonowe oraz czynniki redukujące ekspresję TLR i redukujące efekt TLR (tab. 1).

TABELA 1. Charakterystyka czynników działających hamująco na receptory TLR

Czynniki negatywnej regulacji				Rodzaj TLR, na który działa
Nazwa grupy	Nazwa czynnika	Miejsce występowania	Mechanizm działania	
Rozpuszczalne formy TLR	sTLR2 sTLR4	mleko i surowica krwi nieznane	Działa antagonistycznie do TLR2 Blokuje interakcję TLR4 i MD2	TLR2 TLR4
Wewnątrz- komórkowe receptory	MyD88s	głównie śledziona (ekspresja indukowana LPS)	Działa antagonistycznie do MyD88	TLR4
	IRAKM, IRAK1,2,4 SOCS1	monocyty (ekspresja indukowana LPS) makrofagi (ekspresja indukowana LPS i CpG)	Hamuje fosforylację IRAK1  Obniża działanie IRAK	TLR4, 9  TLR4, 9
	NOD2	nieznane	Obniża działanie NF-κB, kontroluje sekrecję α-defensyn, indukuje ubikwitylację NEMO	TLR2
	PI3K TOLLIP A20	większość komórek większość tkanek makrofagi (ekspresja indukowana LPS)	Hamuje działanie p38, JNK, NF-κB Autofosforyluje IRAK1 Deubikwityluje TRAF6	TLR2,4,9 TLR2, 4 TLR2, 3,4, 9
Regulatory transbłonowe	ST2L	makrofagi (ekspresja indukowana LPS)	Zakłóca działanie MyD88 i MAL	TLR2,4,9
	SIGIRR	komórki nabłonkowe i niedojrzałe DC	Obniża działanie NF-κB	TLR,4,9
	TRAILR	większość komórek i tkanek	Stabilizuje IκBa	TLR2,3,4
Czynniki redukujące ekspresję TLR	TRIAD3A TGF-β i IL-10	większość komórek i tkanek większość komórek i tkanek	Ubikwityluje TLR Indukuje degradację MyD88, hamuje produkcję cytokin prozapalnych	TLR4, 9 TLR3, 4
Czynniki redukujące efekt TLR	FADD, kaspaza-8, NUR77	większość komórek i tkanek	Apoptoza	TLR2

## Rozpuszczalne formy TLR

Pierwszym elementem hamująco oddziałującym na receptory Toll-podobne są ich rozpuszczalne formy, tzw. sTLR (*soluble TLR*) (tab.1), które w sposób najbardziej bezpośredni oddziałują supresyjnie na reakcje odpornościowe [11,15,16]. Dotychczas wykazano jedynie istnienie form rozpuszczalnych receptora TLR2 i TLR4, z tym że wśród sTLR2 opisano sześć izoform, których istnienie warunkowane jest modyfikacjami postranslacyjnymi tych receptorów błonowych [11,15,16]. Formy sTLR2 i sTLR4 mają wielkość od 20 do 85 kDa i występują w stanie fizjologicznym w mleku ludzkim i surowicy krwi i wchodzą w interakcje z rozpuszczalnym CD14 [15,16]. Dzięki obecności sTLR2 dochodzi między innymi do zahamowania produkcji przez makrofagi IL-8 oraz TNF [15,16]. Natomiast w przypadku izoformy sTLR4 stwierdzono, że ma ona możliwość łączenia się z wieloma produktami mRNA pojedynczej kopii genu TLR4, jednakże jak do tej pory nie zidentyfikowano czynnika powodującego ekspresję i indukcję TLR4 [11,16]. Ta rozpuszczalna forma sTLR4 składa się z 122 aminokwasów, z czego aż 86 wykazuje dużą homologię z domeną zewnątrzkomórkową TLR, utworzoną przez domeny z powtórzeniami bogatymi w leucynę LRR (*leucine rich repeats*) – mające zasadnicze znaczenie w rozpoznawaniu patogenów [7,25]. Przyjmuje się, że sTLR4 blokuje interakcję pomiędzy TLR4 i koreceptorami, takimi jak MD2 i CD14, co w efekcie prowadzi do całkowitego zahamowania ścieżki sygnałnej TLR4 [11,16]. Mechanizm hamującego działania związany jest zatem z aktywowaniem receptora CD14, w wyniku tworzenia kompleksu z glikoproteiną adaptorową MD2, co stwarza możliwość rozpoznania LPS bakteryjnego jako ligandu dla TLR4 [7]. Stąd wnioskuje się, że te właśnie dwie rozpuszczalne formy TLR mogą służyć jako istotny element regulacji negatywnej, prowadzący do obniżenia intensyfikacji reakcji UO na patogeny i ich produkty, w wyniku rozpoznania ich przez Toll-podobne receptory [11,15,16]. Ostatnio [8] opisano cząsteczkę RP105, pod względem struktury podobną do TLR4 i określoną jako homolog TLR4. Białko to wykazuje zbliżony mechanizm hamowania TLR4 jak sTLR4, to jest przez cząsteczkę MD2 i MD1. Ponadto wykazano [8], że fizjologicznie RP105 występuje na niedojrzałych komórkach dendrytycznych (DC).

## Wewnątrzkomórkowe receptory

Innymi elementami, działającymi hamująco na TLR, są opisane różnorodne receptory wewnątrzkomórkowe, wśród których wyodrębniono siedem form, to jest: MyD88s, IRAK1, SOCS1, NOD2, PI3K, TOLLIP i A20 (tab. 1).

Jedną z podstawowych molekuł mających wpływ na hamowanie ścieżki sygnałnej TLR – głównie TLR4, jest skrócona forma podstawowej cząsteczki adaptorowej dla receptorów MyD88, to jest MyD88s, której ekspresję stwierdzono w śledzionie oraz w śladowych ilościach w mózgu [7,9,12,16,21,26]. Wykazano także [9,12], że jej ekspresja wzrasta obecność LPS bakteryjnego. Nadekspresja MyD88s, mediowana LPS i IL-1, hamuje aktywację czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B oraz sprzyja powstawaniu heterodimerów MyD88-MyD88s, w obecności których molekula IRAK1, mimo że bierze udział w ścieżce sygnałnej, nie podlega fosforylacji, co uniemożliwia interakcję MyD88s z



IRAK4 [9,12]. Nadto wykazano, że MyD88s, w przeciwieństwie do MyD88, hamuje również zdolność IRAK4 do fosforylowania IRAK1 i z tego względu nie zachodzi interakcja pomiędzy MyD88s a IRAK4 i to jest następna droga negatywnego oddziaływania tejże molekuly w regulacji TLR4 [9,12].

Innym negatywnym elementem wewnątrzkomórkowym wpływającym hamująco na TLR4 i 9 jest białko IRAKM oraz kinazy IRAK1 i 2 wraz z ich wariantami oraz IRAK4 [16,28]. Szczególnie istotną rolę w tym oddziaływaniu odgrywa IRAKM, które to białko wykazuje 30–40% homologię z innymi molekułami IRAK [28]. Pomimo faktu, iż nie został do końca poznany mechanizm działania IRAKM, wykazano, że kinaza ta hamuje fosforylację IRAK1 i 4 oraz stabilizuje kompleks TLR-MyD88-IRAK4, co powoduje opóźnienie oddysocjowania IRAK1 od kompleksu i hamowanie reakcji odpornościowych [16,28]. Dodatkowo wykazano, że nadekspresja wariantów IRAK2 (IRAK2c i IRAK2b), hamuje aktywację czynnika NF- $\kappa$ B, który stymuluje wiele procesów w komórce, w tym także te, które prowadzą do podwyższenia odporności.

Kolejnym czynnikiem z tej grupy jest SOCS1, który wykazuje hamujące działanie na receptor TLR4 i 9. Rolę SOCS1 udowodniono w trakcie stymulacji LPS i CpG DNA myszy z defektem tego czynnika, u których stwierdzono śmierć tych zwierząt po trzech tygodniach na skutek posocznicy, mimo że ich makrofagi produkowały duże ilości cytokin prozapalnych i tlenu azotu [1,13,20]. Dodatkowo zarejestrowano u tych zwierząt wzmogoną fosforylację czynników, takich jak: STAT1, I $\kappa$ B $\alpha$ , p38 i JNK [1,13,20]. Istnieją także dowody, że SOCS1 obok wpływu na TLR4 i TLR9 działa na inne spośród tych receptorów, jednak regulacja ta jest pośrednia i związana jest z hamowaniem ścieżki syntezy IFN typu I [1,13,20].

Dalszym czynnikiem z grupy wewnątrzkomórkowych receptorów, który wykazuje hamujące działanie na TLR, jest proteina NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain*) [14,16,17,22], której supresyjny udział tylko wobec TLR2 został potwierdzony w czasie zakażeń bakteryjnych, choć rolę NOD2 udowodniono również w chorobie Crohna – schorzenia, którego etiologię łączy się z infekcją *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* [7,14,17,22]. Obserwacje nad NOD2 dotyczą głównie reakcji TLR2 z PGN bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W badaniach tych wykazano, że komórki pozbawione NOD2, po połączeniu się TLR2 z PGN, charakteryzują się wzmogoną reakcją odpornościową, co świadczy o specyficznym – negatywnym hamującym efekcie tego czynnika [14,17,22]. Wykazano, że proteiny NOD2 i NOD1, występujące w komórkach mieloidalnych i nabłonkowych, łącząc się z LPS i PGN, aktywują czynnik jądrowy NF- $\kappa$ B poprzez kinazę RICK (*receptor interacting serine/threonine kinase*) i w ten sposób udowodniono istnienie dodatkowej drogi rozpoznawania patogenów [10]. Ponadto wykazano ostatnio [18], że NOD2 ma również znaczenie w przebiegu syndromu Blau – rzadkiego genetycznego defektu autosomalnego, niezwiązanego bezpośrednio z chorobą Crohna. Nadto NOD2 kontroluje także sekrecję antybakteryjnych  $\alpha$ -defensyn oraz indukuje ubikwitylację NEMO [18].

Receptorem wewnątrzkomórkowym o działaniu negatywnym w stosunku do receptorów Toll-podobnych jest także cząsteczką PI3K (tab. 1), której ekspresja ma miejsce w większości komórek makroorganizmów [5,16]. Działanie jej zostało udowodnione w

stosunku do TLR2, TLR4 i TLR9 wobec ligandów, takich jak: LPS, PGN i CpG DNA [5]. Główne zadanie tej cząsteczki związane jest z hamowaniem syntezy IL-12 oraz obniżeniem aktywności czynników p38, JNK i NF- $\kappa$ B, jak także z hamowaniem aktywności limfocytów T<sub>H</sub>1 [5].

Kolejnym czynnikiem z tej grupy wewnątrzkomórkowych receptorów hamująco oddziałujących na TLR jest białko TOLLIP (*Toll-interacting protein*) (tab. 1), która to substancja reaguje z TLR i jest odpowiedzialna za autofosforylację IRAK1 [16,29]. To ostatnie zjawisko może być przyczyną jej ubikwitylacji i degradacji, co uniemożliwia szybkie przeprowadzenie wielu reakcji prowadzących do prawidłowej odpowiedzi immunologicznej poprzez TLR [29].

Natomiast ostatnim z tej grupy elementem działającym hamująco na TLR2, 3, 4 i 9 jest białko A20, którego ekspresję stwierdzono przede wszystkim w makrofagach, choć także rejestruje się je w większości komórek. Działanie tego białka polega na deubikwitylacji TRAF6, co w konsekwencji prowadzi do translokacji NF- $\kappa$ B i obniżenia aktywności UO [3,16]. Wykazano, że makrofagi myszy, w wyniku połączenia się TLR2 z PGN czy kwasem lipoteichowym, TLR3 z łańcuchem polyI:C oraz TLR9 z CpG DNA, niemające A20, produkują zwiększoną ilość cytokin prozapalnych. Stwierdzono także, że A20 bierze udział w zapobieganiu szokowi endotoksycznemu, gdyż hamuje odpowiedź immunologiczną powstającą w wyniku reakcji TLR-ów z LPS [3].

### Regulatory transbłonowe

Do tej grupy czynników białkowych hamująco oddziałujących na receptory Toll-podobne, zalicza się ST2, SIGIRR oraz TRAILR (tab. 1). Receptor sierocy – ST2 (określany również w wielu źródłach jako T1, Fit-1, DER4) stanowi bardzo istotny element negatywnej regulacji TLR2, 4 i 9, szczególnie ze względu na fakt występowania jego w dwóch formach, to jest ST2L i sST2. Ekspresja formy ST2L zachodzi w większości komórek organów hemopoetycznych, podczas gdy ekspresja rozpuszczalnej formy sST2 zachodzi tak w organach hemopoetycznych, jak i niehemopoetycznych [16]. Stwierdzono [16], że pomimo zdolności ST2L do aktywacji ścieżki sygnałnej MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) nie dochodzi do aktywacji czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B. Wykazano również [16], że poprzez formę sST2 negatywna regulacja TLR2 dotyczy głównie chorób manifestujących się stanami zapalnymi [16]. Inną hipotezę [4] o roli ST2 jako negatywnego regulatora TLR wysunięto na podstawie porównywania elementów strukturalnych, które biorą udział w reakcji łączenia się receptora TLR4 z jego ligandami. Dowiedziono, że forma ST2, której prolina w pozycji 431 została zastąpiona histydyną, nie miała hamującego wpływu na ścieżkę sygnałną TLR4 [4].

Również receptor SIGIRR zaliczany jest do receptorów sierocych i podobnie jak ST2L hamuje działanie TLR4 i 9, gdyż nie indukuje aktywacji czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B [16,27]. Jego ekspresja ma miejsce na większości komórek nabłonkowych oraz niedojrzałych komórkach dendrytycznych (DC), co powoduje, że rola jego w aktywacji DC łączy się głównie z ich procesem dojrzewania [16,27].

Trzecim z tej grupy czynnikiem, który mimo braku domeny TIR w swej budowie należy także do rodziny TNF i który ma istotny wpływ na hamowanie aktywności



komórek poprzez TLR2, TLR3 i TLR4, jest TRAILR [16]. Wykazano, że ekspresja tej molekuly ma miejsce w większości komórek i tkanek [16]. Stwierdzono [16], że makrofagi zawierające TRAILR, mimo że dochodzi u nich do połączenia między TLR2, 3 i 4 a ligandami, wykazują obniżoną produkcję cytokin, jako że TRAILR hamuje efekty wywołane przez TLR poprzez stabilizację I $\kappa$ B $\alpha$  [16].

### Czynniki redukujące ekspresję TLR

Wykazano, że hamowanie działania TLR następuje w wyniku ekspresji TGF- $\beta$  i IL-10 oraz TRIAD3A [6,16]. Taki efekt uzyskiwany jest poprzez degradację TLR w drodze ubiquitylacji lub inhibicję ekspresji TLR przez cytokiny antyzapalne, na przykład TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) oraz IL-10 [6,16]. Mechanizm redukcji ekspresji TLR3 i 4 opiera się na inhibicyjnym działaniu tych cytokin antyzapalnych [6,16]. Wykazano, że rola cytokiny TGF- $\beta$  polega głównie na hamowaniu działania TLR4 i indukowaniu degradacji MyD88 poprzez proteosomy, natomiast działanie IL-10 wiąże się z hamowaniem produkcji cytokin prozapalnych, między innymi po stymulacji LPS, lipoarabinomannanem oraz innymi PAMP bakteryjnymi [6,16]. Ponadto wpływ na redukcję ekspresji TLR ma molekula TRIAD3A, występująca na większości komórek i tkanek (tab. 1), której zadaniem jest wiązanie domeny cytoplazmatycznej TLR4 i TLR9 [6,16].

### Czynniki redukujące efekt TLR

Elementem, którego rolę udowodniono w hamowaniu reakcji wywołanych przez receptory Toll-podobne, jest proces apoptozy warunkowany obecnością domeny śmierci – FADD w molekule MyD88, która redukuje efekt działania TLR2 [2,16]. Przypuszcza się, że efekt apoptyczny, który uzyskano w doświadczeniu z wykorzystaniem TLR2 na makrofagach, może dotyczyć również innych TLR, jako że czynnik MyD88 jest praktycznie niezbędny do pobudzenia ich działania [2,16]. Wykazano dwie drogi działania sygnału zmuszającego komórki do apoptozy – drogę zależną i niezależną od kaspaz [2,16]. W drodze zależnej od kaspaz, główna rola dotyczy kaspazy-8, a droga niezależna od tych cząsteczek przebiega przez receptor jądrowy NUR77 (*nuclear-dependent receptor route*) [2,16]. Zatem stwierdzenie istnienia więcej niż jednej ścieżki prowadzącej do apoptozy komórek może dowodzić istoty tego mechanizmu [2,16].

## PODSUMOWANIE

Opisanie pięciu grup czynników (rozpuszczalne formy TLR, wewnątrzkomórkowe receptory, regulatory transbłonowe oraz czynniki redukujące ekspresję TLR i redukujące efekt TLR) wpływających hamująco na efekt działania TLR wskazuje nowe kierunki badań dotyczących tych „superaktywatorów” UO. Odkrycie ich oraz opisanie ligandów, z którymi receptory te łączą się, spowodowało, że badania z tego zakresu nie tylko rzucają nowe światło na obraz i biologię odpowiedzi immunologicznych, ale także stwarzają możliwości poszukiwania nowych rozwiązań, w tym również w zakresie

terapii i zapobieganiu chorobom, głównie tła zakaźnego. Obecnie prezentowany obraz dotyczący elementów hamujących najważniejsze receptory odporności naturalnej, jakimi są TLR, może stanowić element „prawdy” dotyczącej wciąż tajemniczego współgrania ze sobą wielu elementów i procesów biologicznych w ustroju ssaków, w tym człowieka, których pobudzenie musi być także hamowane, bo rozpoznanie i niszczenie mikroorganizmów oraz innych antygenów łączy się i wynika z harmonijnego działania UO.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALEXANDER WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nature Rev Immunol* 2002; **2**: 410–416.
- [2] ALIPRANTIS AO. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* 1999; **285**: 736–739.
- [3] BOONE DL. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like responses. *Nature Immunol* 2004; **5**: 1052–1060.
- [4] BRINT EK, XU D, LIU H, DUNNE A, MCKENZIE ANJ, O'NEILL LAJ, LIEW FY. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signalling and maintains endotoxin tolerance. *Nature Immunol* 2004; **5**: 373–379.
- [5] BURNS K. Tollip, a new component of the IL-1R pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 346–351.
- [6] CHUANG TH, ULEVITCH RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nature Immunol* 2004; **5**: 495–502.
- [7] DEPTUŁA W, TOKARZ-DEPTUŁA B, NIEDŹWIEDZKA P. Rola i znaczenie receptorów Toll-podobnych w odporności. *Post Mikrob* 2005 (w druku).
- [8] DIVANOVIC S, TROMPETTE A, ATABANI SF, MADAN R, GOLENBOCK DT, VISINTIN A, FINBERG RW, TARAKHOVSKY A, VOGEL SN, BELKAID Y, KURT-JONES A, KARP CL. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nature Immunol* 2005; **6**: 571–578.
- [9] HARDIMAN G. Genetic structure and chromosomal mapping of MyD88. *Genomics* 1997; **45**: 332–339.
- [10] INOHARA N, OGURA Y, NUNEZ G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 76–80.
- [11] IWAMI K. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2000; **165**: 6682–6686.
- [12] JANSSENS S, BURNS K, TSCHOPP J, BEYAERT R. Regulation of interleukin-1 and lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 2002; **12**: 467–471.
- [13] KINJYO I. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* 2002; **17**: 583–591.
- [14] KOBAYASHI KS, CHAMAILLARD M, OGURA Y, HENEGARIU O, INOHARA N, NUNEZ G, FLAVELL RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; **307**: 731–744.
- [15] LeBOUDER E, REY-NORES JE, RUSHMERE NK, GRIGOROV M, LAWN SD, AFFOLTER M, GRIFFIN GE, FERRARA P, SCHIFFRIN EJ, MORGAN BP, LABETA MO. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR) 2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 2003; **171**: 6680–6689.
- [16] LIEW FY, XU D, BRINT EK, O'NEILL LAJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Rev* 2005; **5**: 446–458.
- [17] MAEDA S, HSU L-C, LIUH, BANKSTON LA, IIMURA M, KAGNOFF MF, ECKMANN L, KARIN M. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- $\kappa$ B activity and IL-1 $\beta$  processing. *Science* 2005; **307**: 734–738.



- [18] MARTINON F, TSCHOPP J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* 2005; **26**: 447–454.
- [19] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394–397.
- [20] NAKAGAWA R. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 2002; **17**: 677–687.
- [21] O'NEILL LAJ. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol* 2004; **25**: 687–693.
- [22] O'NEILL LAJ. How NOD-ing off leads to Crohn disease. *Nature Immunol* 2004; **5**: 776–778.
- [23] O'NEILL LAJ. Nasz system ostrzegania. *Świat Nauki* 2005; **2**: 30–38.
- [24] SOCHACKA M, BŁACH-OLSZEWSKA Z. Mechanizmy wrodzonej odporności. *Post Hig Med Dośw* 2005; **59**: 250–258.
- [25] SZCZEPAŃSKI MJ, GÓRALSKI M, MOZER-LISEWSKA I, SAMARA H, ŻEROMSKI J. Rola receptorów Toll-podobnych w odporności. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 543–561.
- [26] TOKARZ-DEPTUŁA B, NIEDŹWIEDZKA P, DEPTUŁA W. Nowe receptory w immunologii. *Centaur Lubuski* 2004; **63**: 12–15.
- [27] WALD D, SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunol* 2003; **4**: 920–927.
- [28] WESCHE H. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19403–19410.
- [29] ZHANG G, GHOSH S. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002; **277**: 7059–7065.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 22.12. 2005 r.

Przyjęto: 03.04. 2006 r.

ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

email: kurp13@sus.univ.szczecin.pl





## RAK GRUCZOŁU KROKOWEGO W BADANIACH *IN VITRO*: CHARAKTERYSTYKA LINII KOMÓRKOWYCH PC3, DU145 I LNCaP\*

*IN VITRO* STUDIES ON PROSTATE CANCER: CHARACTERISTICS  
OF PC3, DU145 AND LNCaP CELL LINES

Anna STACHURSKA, Michał WRONKA, Hanna M. KOWALCZYŃSKA

Zakład Biofizyki  
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

**Streszczenie:** W krajach wysoko rozwiniętych rak stercza jest drugą po raku płuc najczęstszą przyczyną śmierci mężczyzn. Wczesne wykrycie tego nowotworu pozwala na skuteczną terapię, jednak u chorych ze stwierdzonymi przerzutami szanse na wyleczenie znacznie maleją. Kluczowe w leczeniu raka gruczołu krokowego jest zapobieganie przerzutom, dlatego w wielu laboratoriach prowadzone są badania modelowych linii komórkowych, mające wyjaśnić molekularne mechanizmy powstawania przerzutów. Pomimo bardzo wielu artykułów w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w piśmiennictwie polskim prace przeglądowe poświęcone tej tematyce są nieliczne. Celem niniejszego artykułu jest zaprezentowanie aktualnego stanu wiedzy z zakresu badań *in vitro* nad rakiem stercza. Zebrano wyniki doświadczeń przeprowadzonych na klasycznych liniach komórkowych: PC3, DU145 i LNCaP wyizolowanych, odpowiednio, z przerzutów do kości, mózgu i węzłów chłonnych. Opisano morfologię komórek i przypuszczalny mechanizm powstawania przerzutów. Omówiono cząsteczki adhezyjne i niektóre antygeny biorące udział w adhezji. Przedstawiono wyniki dotyczące zarówno mechanizmów hormonalnej regulacji wzrostu oraz migracji komórek, jak i unikania przez nie apoptozy.

**Słowa kluczowe:** rak stercza, DU145, PC3, LNCaP, adhezja komórek, cząsteczki adhezyjne, przerzuty nowotworowe.

**Summary:** Prostate cancer is the second most common malignancy in men worldwide. Early diagnosis of the disease makes the therapy possible however patients with metastasis have a much lower recovery chance. *In vitro* studies carried out worldwide in the last decade, have raised hopes of solving the problem of the molecular mechanism of metastases, but despite many experiments some aspects of the metastasis process still remain unclear. In this review we present recent information on the prostate cancer cell lines PC3, DU145 and LNCaP, derived from bone, brain, and lymph node metastases, respectively. The

characterization of membrane receptors, including cell adhesion molecules is described. We also demonstrate the putative mechanisms of migration, apoptosis and hormonal growth regulation of the above-mentioned cells.

*Key words:* prostate cancer, DU145, PC3, LNCaP, cell adhesion, cell adhesion molecules, cancer metastasis.

## WSTĘP

Gruczoł krokowy (stercz, prostata) jest narządem, który w męskiej populacji często ulega procesom chorobowym. Podczas gdy u młodych mężczyzn schorzeniem dominującym stercza jest zapalenie gruczołu krokowego (*prostatitis*), to u osób starszych (po 40 roku życia) częściej występuje łagodny rozrost stercza (BPH, ang. *benign prostate hyperplasia*) i nowotwór złośliwy gruczołu krokowego (PCa, ang. *prostate cancer*) [37,38,65]. Należy zaznaczyć, że żadne z tych schorzeń nie wyklucza jednoczesnego wystąpienia drugiego.

Przebieg procesu nowotworzenia w raku stercza jest trudny do przewidzenia. Zazwyczaj choroba rozpoczyna się od pojedynczego ogniska zlokalizowanego w zewnętrznej części gruczołu. W takiej postaci nie daje objawów i nazywa się stadium ograniczonym do narządu. Po pewnym czasie nowotwór rozrasta się, nacieka stercz i tkanki okołosterczowe, przechodząc w stan określany mianem raka miejscowo zaawansowanego. W tym czasie chory zaczyna odczuwać dolegliwości podobne do takich jak w łagodnym przeroście gruczołu krokowego, tj. częstomocz, parcia naglące i trudności w oddawaniu moczu. Z czasem komórki raka stercza mogą naciekać okoliczne tkanki, przemieszczać się drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych do innych miejsc organizmu i tworzyć tam przerzuty. Wykazano, że wtórne ogniska przerzutowe są najczęstszą przyczyną zgonu pacjentów cierpiących na raka gruczołu krokowego [54].

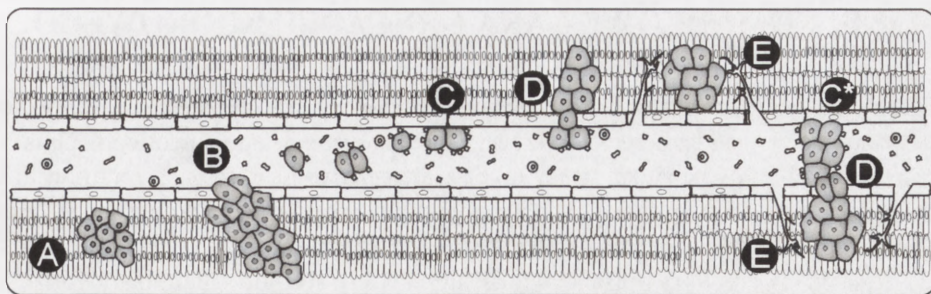
W krajach wysoko rozwiniętych rak stercza jest najczęściej stwierdzanym nowotworem złośliwym. Według danych American Cancer Society, w 2004 roku rozpoznano w USA 230 000 nowych przypadków raka gruczołu krokowego; okazało się, że nowotwór ten był przyczyną śmierci ponad 30 000 mężczyzn, co klasyfikuje go na drugim po raku płuc miejscu pod względem śmiertelności [33]. Wczesne wykrycie tego nowotworu pozwala na skuteczną terapię, jednak u chorych ze stwierdzonymi przerzutami szanse na wyleczenie znacznie maleją.

Celem tego artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu badań *in vitro* nad rakiem stercza oraz charakterystyka trzech klasycznych linii komórkowych PC3, DU145 i LNCaP, wykorzystywanych przez ostatnie trzy dekady w tych badaniach.

## MECHANIZM POWSTAWANIA PRZERZUTÓW NOWOTWOROWYCH

Powstawanie przerzutów jest procesem wieloetapowym, w którym właściwości adhezywne oraz zdolność komórek nowotworowych do aktywnego ruchu są ważnymi





RYCINA 1. Schemat powstawania przerzutów nowotworowych (objaśnienia w tekście)

czynnikami determinującymi ich inwazyjność. Badania *in vitro* nad szczurzymi liniami komórkowymi raka stercza różniącymi się inwazyjnością przeprowadzone przez zespół Korohody i Madei pokazały, że oddziaływania homotypowe między komórkami nowotworowymi oraz oddziaływania heterotypowe między komórkami nowotworowymi a prawidłowymi powodują wzrost średniej prędkości migracji komórek raka [41,43].

Opierając się na wynikach badań klinicznych i doświadczalnych można przyjąć, że mechanizm powstawania przerzutów jest podobny w przypadku różnych nowotworów. Początkowo rozwijający się nowotwór nie nacieka sąsiadujących tkanek (stadium przedinwazyjne) (ryc. 1 A). Tworzenie przerzutów zapoczątkowuje inwazja sąsiednich tkanek, co jest związane z zanikiem połączeń między komórkami guza. Komórki rozpoczynają aktywną migrację przechodząc przez błonę podstawną, po czym przedostają się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych (intrawazacja) (ryc. 1 B). Uwolnione z guza komórki są przenoszone biernie przez krew do odległych miejsc w organizmie, gdzie adherują specyficznie do komórek śródbłonna naczyń (ryc. 1 C) lub zostają mechanicznie zatrzymane w naczyniach włosowatych, gdzie mogą tworzyć zatory (ryc. 1 C\*). W miejscu zatrzymania dochodzi do adhezji między komórkami nowotworowymi a komórkami śródbłonna, następnie komórki rakowe przemieszczają się między komórkami śródbłonna i wydostają się z naczynia (ekstrawazacja) (ryc. 1 D). Pod wpływem wielu czynników obecnych w miejscu, do którego przedostały się komórki, zaczynają one proliferować i tworzyć wtórne ogniska nowotworowe [52,66], a w guzach o średnicy większej niż 0,2 cm dochodzi do procesu angiogenezy, co pozwala na dalszy rozrost tkanki nowotworowej [19] (ryc. 1 E).

Molekularny mechanizm tłumaczący, dlaczego rak gruczołu krokowego daje przerzuty w określone miejsca organizmu, nie został dotąd wyjaśniony. Powszechnie znana i akceptowana jest teoria „ziarna i gleby” (ang. „Seed and Soil”). Według niej komórki nowotworowe (nasiona) krążą w organizmie, zakotwiczą się i namnażają tam, gdzie znajdą najlepsze warunki do wzrostu (gleba) [47]. W zaawansowanym stadium choroby przerzuty rozwijają się głównie w kościach, ale także w węzłach chłonnych, mózgu, wątrobie i płucach. Wśród pacjentów, którzy umarli z powodu raka stercza, stwierdzono obecność przerzutów do kości aż u 90% chorych [48].

## LINIE KOMÓRKOWE RAKA GRUCZOŁU KROKOWEGO

Badania *in vitro* nad liniami komórkowymi pochodzącymi z raka stercza trwają już od dwóch dziesięcioleci i są źródłem wiedzy na temat patogenezы tego nowotworu. Opisano kilkaset linii komórkowych wyprowadzonych z guza pierwotnego oraz z przerzutów [57]. Szczególnie intensywnie badane są trzy niżej wymienione linie komórkowe pochodzenia nabłonkowego, wyizolowane z najczęstszych miejsc przerzutów:

**PC3** – linia po raz pierwszy opisana przez Kaighna [34]. Komórki tej linii wywodzą się z przerzutów do kości i charakteryzują się dużą inwazyjnością (stadium IV) [67];

**DU145** – linia pochodząca z przerzutów do mózgu wyizolowana przez Stone'a [59].

Komórki tej linii charakteryzują się stosunkowo małą inwazyjnością w porównaniu z komórkami PC3 (stadium II) [57,67];

**LNCaP** – linia komórek wyizolowanych po raz pierwszy przez Horoszewicza z przerzutów raka gruczołu krokowego do nadobojczykowego węzła chłonnego [27]. W badaniach *in vitro* charakteryzują się one stosunkowo powolnym wzrostem [67].

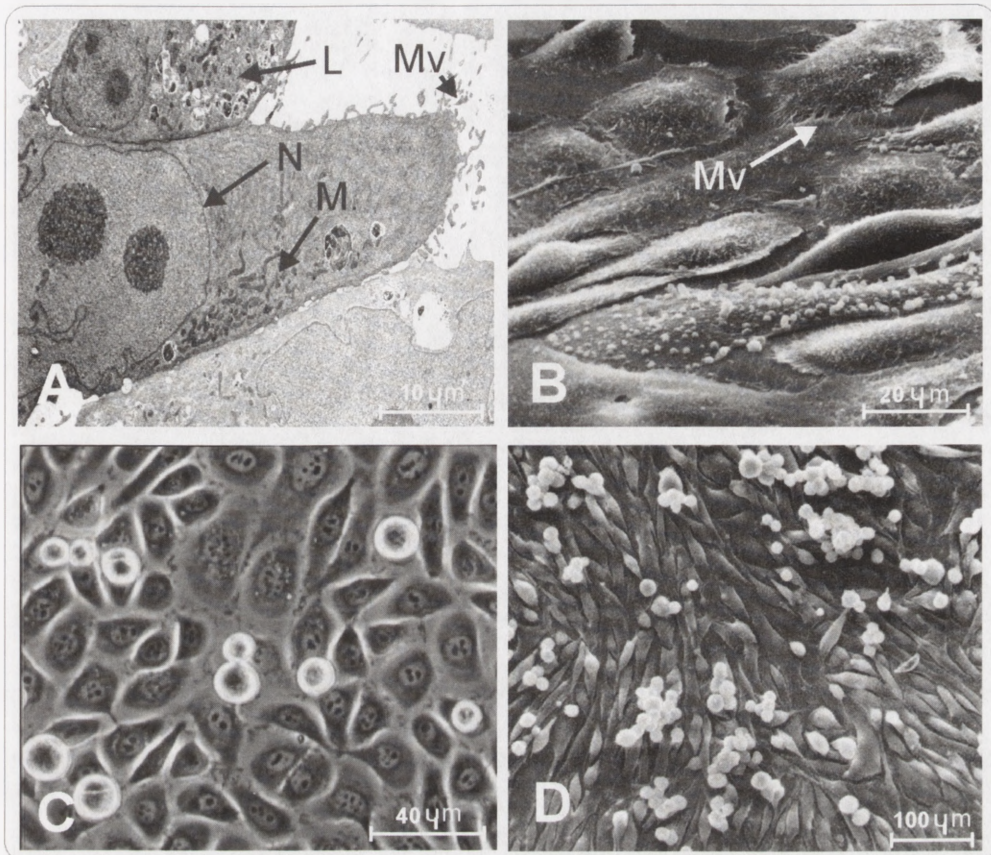
Komórki tych linii różnią się zarówno stopniem inwazyjności, jak i wrażliwością na leczenie hormonalne (PC-3, DU-145-linie niewrażliwe na terapię hormonalną, linia LNCaP-wrażliwa) i wydają się być dobrym modelem do badań *in vitro* nad rakiem stercza.

## MORFOLOGIA KOMÓREK PC3, DU145 I LNCaP

Komórki opisywanych linii wykazują morfologię charakterystyczną dla komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego, o czym świadczy ekspresja specyficznych cytokeratyn 8 i 18, brak desminy i czynnika VIII [67]. Morfologię komórek raka stercza przedstawiono na przykładzie komórek PC3 (ryc. 2). Wspólną cechą nowotworowych linii raka gruczołu krokowego jest obecność w komórkach anormalnych jąder, jąderek oraz mitochondriów. W cytoplazmie zwraca uwagę obecność ziarnistości i ciał tłuszczowych oraz duża liczba lizosomów i mitochondriów (ryc. 2 A), co świadczy o intensywnym metabolizmie typowym dla komórek nowotworowych. Na zdjęciach z mikroskopu elektronowego widoczne są liczne charakterystyczne mikrowypustki (ryc. 2 A,B). W hodowlach *in vitro* komórki PC3, DU145 i LNCaP wykazują brak inhibicji kontaktowej, co prowadzi do wielowarstwowego wzrostu (ryc. 2 C,D). Wynika to przede wszystkim z różnic w budowie błony komórek prawidłowych i nowotworowych (np. odmienna glikozylacja białek i lipidów).

Stwierdzono, że w procesie powstawania przerzutów nowotworowych kluczową rolę odgrywają oddziaływania między komórkami nowotworowymi, między komórkami nowotworowymi a komórkami prawidłowymi oraz między komórkami nowotworowymi a macierzą zewnątrzkomórkową [42,68]. Oddziaływania te prowadzą do adhezji komórek, a receptory błonowe w nich uczestniczące zidentyfikowano zarówno na powierzchni komórek normalnych, jak i nowotworowo zmienionych.





RYCINA 2. Morfologia komórek raka stercza (linia PC3). Obraz otrzymany z zastosowaniem mikroskopii elektronowej (A), widoczne organelle komórkowe (N – jądro, M – mitochondria, L – lizosomy, Mv – mikrowypustki); obraz otrzymany z zastosowaniem mikroskopii skaningowej (B), widoczne mikrowypustki komórek (Mv); obraz otrzymany z zastosowaniem metody kontrastu fazowego (C); obraz otrzymany z zastosowaniem mikroskopii skaningowej (D). Mikrografy A, B, D zmodyfikowane wg [34] i C wg A. Stachurska [nieopublikowane]

## RECEPTORY KOMÓREK RAKA GRUCZOŁU KROKOWEGO

### Cząsteczki adhezyjne

Na każdym etapie procesu powstawania przerzutów raka stercza istotną rolę odgrywają cząsteczki adhezyjne (CAM, ang. *cell adhesion molecules*). Na powierzchni komórek PC3, DU145 i LNCaP zidentyfikowano wiele typów CAM (tab. 1) należących do rodzin integryn, kadheryn i białek typu immunoglobulin. Rozmieszczenie i aktywność wyżej wymienionych cząsteczek decydują o procesie adhezji. Na żadnej z opisywanych linii komórkowych nie stwierdzono obecności selektyn.

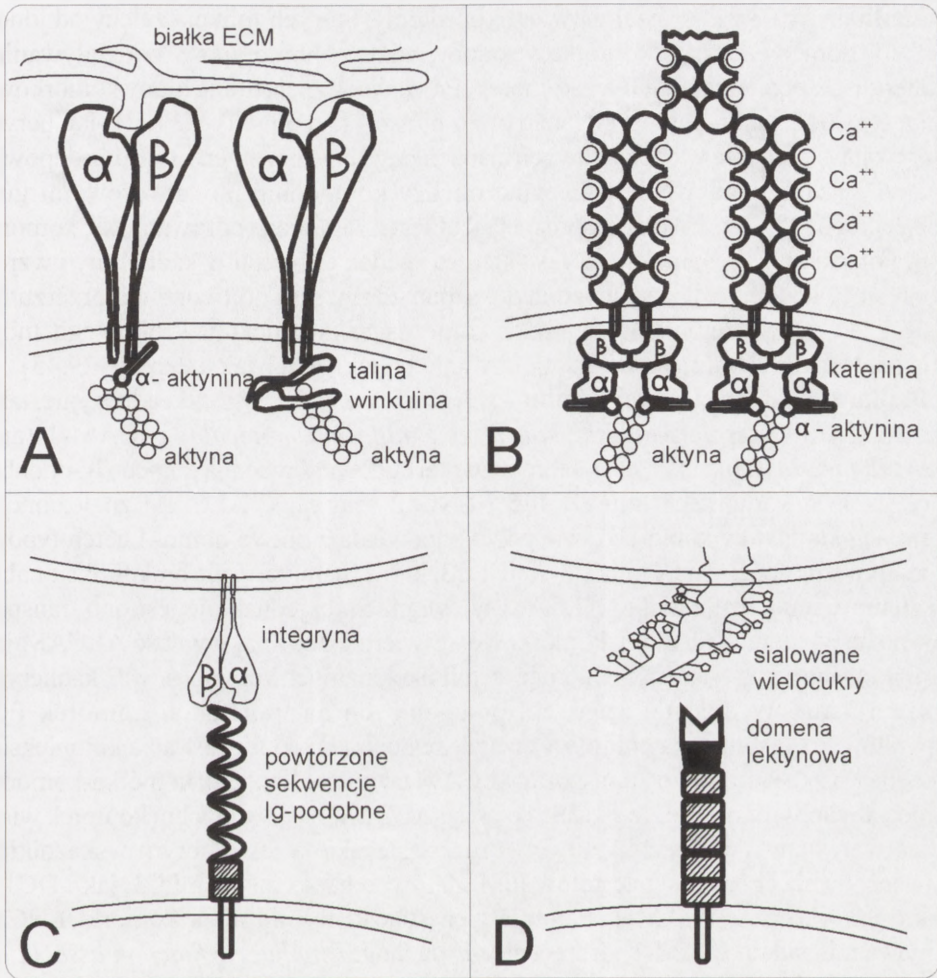
**Integryny** – zbudowane są z dwóch połączonych niekowalencyjnie podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ . W każdej z nich znajdują się trzy domeny: duża zewnątrzkomórkowa (aminotermini-

TABELA 1. Występowanie cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek raka stercza linii PC3, DU145 i LNCaP [3,4,7,10,13,20,30,36,45,50,56,58,62–65,70]

Cząsteczki adhezyjne	Ligandy	Komórki raka stercza		
		PC3	DU145	LNCaP
<b>Integryny</b>				
$\alpha_{IIb}\beta_3$	fibronektyna, fibrynogen, trombospondyna, witronektyna	+	+	brak danych
$\alpha_v\beta_1$	fibronektyna, osteopontyna	+	+	-
$\alpha_v\beta_3$	fibronektyna, fibrynogen, kolagen, laminina, osteonektyna, osteopontyna, trombospondyna, witronektyna	+	+	+
$\alpha_v\beta_5$	osteonektyna, osteopontyna, witronektyna	+	-	-
$\alpha_2\beta_1$	kolagen, laminina	+	+	+
$\alpha_3\beta_1$	epiligryna, fibronektyna, inwazyjna, kolagen, laminina	+	+	+
$\alpha_5\beta_1$	fibronektyna, inwazyjna	+	+	+
$\alpha_6\beta_4$	laminina, osteopontyna, witronektyna	+	+	+
<b>Kadheryny</b>				
E-Kadheryny	adhezja homotypowa	+	+	+
N-Kadheryny	adhezja heterotypowa	+	-	-
P-Kadheryny	adhezja heterotypowa	+	+	-
<b>Białka z rodziny immunoglobulin</b>				
ALCAM	CD6, adhezja homotypowa	-	+	+
ICAM-1	LFA-1, MAC 1	+	+	-
Selektyny	-	-	-	-

nalna), transbłonowa i mała wewnątrzkomórkowa (karboksyterminalna) [1,30]. Część zewnątrzkomórkowa może wiązać się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) i białkami błony podstawnej (fibronektyną, witronektyną, trombospondyną, lamininą i kolagenem) oraz z receptorami komórek śródbłonna – VCAM (ang. *vascular cell adhesion molecules*). Część wewnątrzkomórkowa wiąże się z cytoszkieletem aktynowym komórki przez białka pośredniczące, takie jak: talina, winkulina i  $\alpha$ -aktylina (ryc. 3 A). Wyjątek stanowi integryna  $\alpha_6\beta_4$  wiążąca się do filamentów pośrednich, której obecność stwierdzono w hemidesmosomach [20,58]. W wyniku interakcji domeny aminoterminalnej z określonym ligandem dochodzi do grupowania się i zwiększonej aktywności receptorów integrynowych. Następuje reorganizacja cytoszkieletu, komórka zmienia kształt i rozplaszcza się (ang. *spreading*). W efekcie dochodzi do utworzenia włókien naprężeniowych oraz kontaktów zogniskowanych [55]. W doświadczeniach polegających na usunięciu wewnątrzkomórkowej





RYCINA 3. Schemat budowy cząsteczek adhezyjnych: integryny (A), kadheryny (B), białka z rodziny immunoglobulin (C), selektyny (D)

domeny integryn wykazano, że w komórkach nowotworowych, podobnie jak w normalnych, dochodzi do interakcji integryny z ligandem, nie zachodzi jednak dalsza część kaskady sygnałowej prowadzącej do powstania kontaktów zogniskowanych [2]. Integryny oprócz udziału w adhezji, funkcjonują jak klasyczny receptor błonowy i w sposób aktywny przekazują sygnał do wnętrza komórki [18,45]. Wtórnymi przekaźnikami sygnału integrynowego są cytoplazmatyczne kinazy MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) i FAK (ang. *focal adhesion kinase*). W niezmiennych nowotworowo komórkach aktywność tych kinaz decyduje o prawidłowym przebiegu kluczowych procesów, takich jak: migracja, różnicowanie i apoptoza. Komórki raka stercza wykazują zwiększoną aktywność MAPK i FAK, co powoduje zahamowanie procesu apoptozy i wzrost zdolności do migracji [20].

**Kadheryny** – są to transbłonowe glikoproteiny, których funkcja zależy od jonów  $\text{Ca}^{+2}$ . Ich domeny zewnątrzkomórkowe odpowiadają za homotypowe oddziaływania z kadherynami powierzchni innych komórek. Po wewnętrznej stronie błony komórkowej kadheryny oddziałują z cytoszkieletem przez białka – kateniny (ryc. 3 B). E-kadheryny odgrywają istotną rolę w początkowych etapach powstawania przerzutu, gdyż odpowiedzialne są za oddziaływania adhezyjne między komórkami nowotworowymi guza pierwotnego [42,63]; wysoka ekspresja E-kadheryn zapobiega odrywaniu się komórek [60]. Pokazano, że w komórkach raka stercza spadek ekspresji E-kadheryny i wzrost ekspresji N-kadheryn wiąże się ze zwiększoną zdolnością do tworzenia przerzutów [7,63]. Do zwiększenia inwazyjności komórek raka gruczołu krokowego mogą prowadzić także zaburzenia w funkcjonowaniu białek, takich jak kateniny [29,45].

**Białka z rodziny immunoglobulin** – zalicza się do nich cząsteczki adhezyjne, takie jak: ALCAM (ang. *activated leukocyte cell adhesion molecule*) i ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecules*), które w swojej budowie zawierają domenę Ig-podobną (ryc. 3 C). W komórkach linii DU145 i LNCaP cząsteczki ALCAM znaleziono w miejscach kontaktów komórek guza, gdzie odpowiadają one za homo- i heterotypowe oddziaływania adhezyjne. Komórki linii PC3, które charakteryzuje brak funkcjonalnej  $\alpha$ -kateniny, syntetyzują białko ALCAM w cytoplazmie, jednak nie jest ono transportowane na powierzchnię błony komórkowej. Stwierdzono, że aktywność ALCAM jest warunkowana przez obecność w komórkach funkcjonalnych kompleksów E-kadheryn z  $\alpha$ -kateninami. W doświadczeniach, polegających na transfekcji komórek PC3 prawidłowym genem  $\alpha$ -kateniny, wykazano, że dochodzi do formowania kompleksów E-kadheryn z  $\alpha$ -kateninami i transportu ALCAM do miejsc kontaktu komórka-komórka. Ponieważ zaobserwowano, że spadek ekspresji ALCAM na powierzchni komórek wiąże się ze wzrostem inwazyjności nowotworu, cząsteczka ta jest dobrym wskaźnikiem zaawansowania choroby u pacjentów [62]. Zarówno na komórkach PC3, jak i DU145 wykazano obecność ICAM-1, natomiast cząsteczki tej nie mają komórki LNCaP. Ponieważ ligandem ICAM-1 jest receptor LFA (ang. *lymphocyte function associated*) obecny na powierzchni limfocytów, istnieje przypuszczenie, że brak ICAM-1 chroni komórki LNCaP przed cytotoksycznym działaniem komórek odpornościowych obecnych w węzłach chłonnych.

**Selektyny** – należą do glikoprotein, zawierających domenę lektynową, rozpoznającą reszty węglowodanowe na powierzchni komórek (ryc. 3 D). Na komórkach raka stercza nie stwierdzono obecności selektyn [50], wykazano natomiast obecność sialowanych glikoprotein, zawierających antygen Lewisa (SLeX, ang. *sialyl Lewis X*) i będących ligandami dla selektyn. Oddziaływanie sialowanych glikoprotein komórek raka stercza z E-selektynami komórek śródbłonna, powoduje chwilowe zatrzymanie i słabą adhezję komórek nowotworowych [14,15]. Dzięki inicjującemu oddziaływaniu selektyn i sialowanych glikoprotein, w kolejnych etapach tworzenia przerzutu możliwa jest silna adhezja poprzez inne cząsteczki adhezyjne i ekstrawazacja komórek nowotworowych [46].



## Receptory hormonów płciowych

Gruczoł krokowy podlega ścisłej regulacji hormonalnej. Stymulowane przez przysadkę komórki Leydiga znajdujące się w jądrach wydzielają testosteron, który przedostaje się do nabłonka gruczołowego stercza, przekształcając się w aktywny dihydrotestosteron (DHT, ang. *dihydrotestosterone*). Działając przez receptor dla androgenów (AR, ang. *androgen receptor*) DHT wpływa na syntezę białek indukując odpowiedź komórek nabłonkowych. Receptor AR jest jednym z czynników transkrypcyjnych, który po związaniu liganda stymuluje ekspresję genów odpowiedzialnych za rozwój i proliferację komórek [16].

W początkowych stadiach raka gruczołu krokowego, kiedy komórki wykazują mały stopień zróżnicowania, rozwój nowotworu uzależniony jest od obecności hormonów płciowych. W późniejszych stadiach komórki stają się androgeno-niezależne [17,32].

Opisywane linie komórkowe wykazują różną wrażliwość na wymienione hormony. Jedynie komórki LNCaP mają funkcjonalne receptory androgenów. Na skutek punktowej mutacji w genie receptora jego aktywność w komórkach nowotworowych jest dużo wyższa niż w prawidłowych. W komórkach linii DU145 wykryto wysoką ekspresję nieaktywnego receptora AR, co jest najprawdopodobniej spowodowane zmianą w obrębie domeny wiążącej, która uniemożliwia połączenie z ligandem. Natomiast komórki linii PC3 wykazują znikomą ekspresję prawidłowego receptora AR, dlatego testosteron nie ma wpływu na ich wzrost [67].

Synergistycznie z androgenami na funkcjonowanie gruczołu krokowego mają wpływ także estrogeny (estron i 17- $\beta$ -estradiol), które regulują wzrost i różnicowanie komórek [16]. Pomimo to, że w badaniach *in vitro* wykazano hamujący wpływ estradiolu na wzrost komórek PC3, to zarówno w cytoplazmie komórek tej linii, jak i DU145 i LNCaP nie stwierdzono obecności receptora ER (ang. *Estrogen receptor*) [26]. Wyniki prac poświęconych obecności receptora w komórkach raka stercza są jednak często sprzeczne, a zagadnienie to wymaga dalszych badań [26, 28, 40].

## Receptory czynników wzrostu

**TGF- $\beta$**  – spośród pięciu opisanych klas transformującego czynnika wzrostu (TGF, ang. *transforming growth factor*), w komórkach raka stercza PC3 i DU145 znaleziono receptory dla TGF- $\beta$ 1. Badania *in vitro* wykazały, że TGF- $\beta$ 1 nie ma wpływu na wzrost androgeno-zależnej linii komórek LNCaP, natomiast w stopniu zależnym od dawki hamuje on rozwój komórek PC3 i DU145 [8,67]. Komórki tych dwóch linii mają także zdolność do syntezy i wydzielania aktywnej formy TGF- $\beta$ 1 [5,12].

**EGF i TGF- $\alpha$**  – oba czynniki działają poprzez receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*), który zidentyfikowano na powierzchni komórek linii PC3, DU145, LNCaP. Wykazano, że komórki te mają zdolność do endogennej syntezy EGF i TGF- $\alpha$  [67], i że oba te czynniki po związaniu z receptorem EGF stymulują wzrost komórek. W przypadku androgeno-zależnej linii LNCaP, uwrażliwienie komórek na autokrynne czynniki wzrostowe możliwe jest dopiero po stymulacji hormonami płciowymi, gdyż dochodzi wówczas do zwiększenia ekspresji receptora [4,8].

**IGF** – spośród dwóch typów receptorów wiążących insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF, ang. *insulin-like growth factor*), w regulację proliferacji komórek gruczołu krokowego zaangażowany jest receptor wiążący prawie wyłącznie IGF-I. Wykazano, że IGF-I stymuluje proliferację komórek PC3 i DU145, natomiast nie zaobserwowano stymulacji w przypadku komórek LNCaP [67].

**FGF** – komórki raka stercza linii PC3 i DU145 syntetyzują endogennie czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *fibroblast growth factor*). Na ich powierzchni obecny jest receptor dla tej cząsteczki. Okazało się, że tylko komórki linii DU145 odpowiadają na FGF intensywniejszą proliferacją, natomiast w hodowlach PC3 czynnik ten nie wywołuje takiego efektu [4,67]. Aktywacja receptora dla czynnika FGF (FGFR1) jest istotna we wczesnym stadium nowotworzenia [39]. Stymulacja komórek poprzez FGF powoduje aktywację czynnika wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelium growth factor*) indukującego angiogenezę [21].

## ADHEZJA I MIGRACJA KOMÓREK RAKA GRUCZOŁU KROKOWEGO

W procesie powstawania przerzutów komórki raka stercza migrują z ogniska pierwotnego do kości, węzłów chłonnych, płuc, wątroby i mózgu. Zbadano, że u większości pacjentów głównym miejscem inwazji nowotworowej jest mikrośrodowisko szpiku [36]. Molekularne i komórkowe mechanizmy procesu nowotworzenia nie są dobrze poznane. Podczas rozrostu guza pierwotnego w komórkach położonych w strefie brzegowej dochodzi do zmniejszenia ekspresji E-kadheryn i wzrostu ekspresji N-kadheryn [51,61]. Prowadzi to do zmniejszenia oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi i zwiększenia oddziaływania komórek nowotworowych z komórkami otaczającej je mezenchymy, co powoduje odrywanie pojedynczych komórek od guza pierwotnego. W kolejnym etapie powstawania przerzutu istotną rolę odgrywa trombina, która przedostaje się do tkanki otaczającej nowotwór na skutek zjawiska opisanego jako „przeciekanie” śródbłónka [9]. Zarówno na komórkach raka gruczołu krokowego, jak i śródbłónka wykazano obecność receptora trombin (PAR, ang. *platelet activated receptor*). Aktywacja PAR na powierzchni komórek raka stercza powoduje wzrost adhezji do białek macierzy oraz wydzielanie metaloproteinaz (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*), kolagenazy, stromalizyny, gelatynazy [9]. Enzymy te trawią ECM oraz błonę podstawną, co pozwala na migrację komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych lub limfatycznych. Aktywacja białka PAR na powierzchni komórek nowotworowych powoduje również wzrost ekspresji integryn, takich jak:  $\alpha_{IIb}\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_3$ . Integryny te zidentyfikowano także na powierzchni płytek krwi. Ligandami  $\alpha_{IIb}\beta_3$  oraz  $\alpha_v\beta_3$  są białka odpowiedzialne za krzepnięcie krwi (fibryna, fibrynogen) [6,64]. Białka te pośredniczą w oddziaływaniu komórek nowotworowych z płytkami krwi, co prowadzi do powstawania heterogennych, wielokomórkowych agregatów. Utworzenie agregatów umożliwia komórkom nowotworowym przeżycie, gdyż chroni je przed odpowiedzią



immunologiczną oraz działaniem sił fizycznych powodowanych przez warunki hydrodynamiczne panujące w układzie krążenia [6]. Podczas procesu nowotworowego w organizmie rozwija się ogólnoustrojowy stan zapalny. Efektem tego jest wzrost stężenia cytokin prozapalnych w krwi obwodowej. Wykazano, że cząsteczki, takie jak: TNF- $\alpha$  stymulują komórki śródbłonka naczyń do zwiększonej ekspresji E-selektyn i cząsteczek VCAM [12]. Na powierzchni komórek raka gruczołu krokowego ligandami E-selektyn śródbłonka są glikoproteiny, takie jak: PSGL-1 (ang. *P-selectin glycoprotein ligand-1*), zawierające antygen SLeX [15]. Dzięki oddziaływaniom E-selektyn i sialowanych glikoprotein może dojść do „toczenia się” (*rolling*) komórek nowotworowych po warstwie komórek śródbłonka [14]. W wyniku zbliżenia komórek nowotworowych do komórek śródbłonka na odległość około 20 nm może dojść do początkowo słabych (*docking*), a następnie silnych oddziaływań adhezyjnych (*locking*) [46]. W pierwszym etapie adhezji (*docking*) istotną rolę odgrywa oddziaływanie domeny węglowodanowej antygeny Thomsena-Friedenreicha komórek raka stercza z galektyną-3 komórek śródbłonka [23]. Dalszy etap tworzenia silnej adhezji obejmuje oddziaływanie integryn komórek nowotworowych z VCAM komórek śródbłonka. Następnie komórki nowotworowe przemieszczają się między komórkami śródbłonka, adherują do białek ECM i migrują do miejsc, gdzie mogą utworzyć wtórne ognisko [52].

Pod wpływem czynników chemotaktycznych zaadherowane komórki nowotworowe mogą rozpocząć migrację do kości, a wzmożona aktywność PAR i MMPs umożliwia przechodzenie komórek nowotworowych przez śródbłonek [9]. Do rozwoju guza wtórnego przyczyniają się także komórki obecne w mikrośrodowisku kości (osteoblasty i osteoklasty). Dostarczają one komórkom nowotworowym niezbędnych czynników angiogennych, adhezyjnych i wzrostowych [31,69].

Przy tworzeniu przerzutów do kości, w przypadku silnej adhezji komórek raka gruczołu krokowego do śródbłonka naczyń odbywającej się z udziałem integryn, podkreśla się znaczenie dimerów zawierających podjednostki  $\beta_1$  [12,14,20,56]. Duża liczba cząstek TGF- $\beta$  w kostnej ECM stymuluje komórki raka stercza do ekspresji integryny  $\alpha_2\beta_1$  (receptor kolagenu I). W efekcie komórki nowotworowe adherują do macierzy szpiku, utworzonej głównie z kolagenu I i osteopontyny. Rozwój komórek nowotworowych w kości wymaga aktywności osteoblastów i osteoklastów. Osteoblasty wydzielają szereg czynników wzrostowych (bFGF, PDGF, EGF, IGF I, IGF II, BMPs, TGF $\alpha$ ), które bez osteolitycznej aktywności osteoklastów byłyby niedostępne dla komórek nowotworowych. Aktywacja osteoklastów przez komórki PCa powoduje bowiem resorpcję kości i uwalnianie czynników wzrostu, stymulujących podziały komórek nowotworowych i tworzenie przerzutów w kości [36].

Szczególną rolę w powstawaniu przerzutów raka gruczołu krokowego do kości przypisuje się integrynom  $\alpha_5\beta_3$ , które pośredniczą w adhezji i migracji komórek PC3 oddziałując z osteopontyną i witronektyną [9,13,44,70]. Integryny  $\alpha_5\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_1$  oraz  $\alpha_4\beta_1$  są istotnymi receptorami pośredniczącymi w oddziaływaniu komórek PC3 z fibronektyną [3,20]. Porównując oddziaływanie komórek PC3 z fibronektyną, lamininą, kolagenem i transferyną, zaobserwowano największe powinowactwo tych komórek do lamininy, natomiast nie zaobserwowano adhezji do transferyny [10,11].

## ZABURZENIA APOPTOZY KOMÓREK PC3, DU145 I LNCaP

Programowana śmierć komórek prawidłowych obejmuje szereg przemian biochemicznych (aktywacja kaspaz, wydzielanie cytochromu c, pojawienie się fosfatydyloseryny na powierzchni komórki) oraz morfologicznych (obkurczanie komórki, kondensacja chromatyny i rozpad jądra). Apoptoza może być zapoczątkowana przez czynniki fizjologiczne, takie jak: hormony, cytokiny, wirusy, niefizjologiczne czynniki chemiczne (cytostatyki, wolne rodniki tlenowe) oraz czynniki fizyczne (promieniowanie UV i jonizujące) [53].

W początkowym etapie programowanej śmierci, w zależności od rodzaju bodźca i typu komórki, aktywowane są odpowiednie drogi sygnałowe: zewnątrzkomórkowa, indukowana przez ligand Fas oraz wewnątrzkomórkowa kaskada sygnałowa indukowana przez czynniki fizyczne powodujące wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$ . Te szlaki przekazywania sygnału prowadzą do aktywacji efektorowych kaspaz, fragmentacji DNA i śmierci komórki. Nieprawidłowo funkcjonujące szlaki apoptozy w komórkach mogą powodować transformację nowotworową. Badania ostatnich lat skoncentrowane na zrozumieniu molekularnych podstaw apoptozy mogą przyczynić się do zastosowania właściwej terapii nowotworów [35,53].

Linie komórkowe raka stercza, których wzrost nie zależy od hormonów płciowych (PC3 i DU145), wykształciły szereg mechanizmów uniemożliwiających prawidłowy przebieg apoptozy. Zaburzenia te związane są m.in. z nadekspresją białek antyapoptotycznych Bcl<sub>xl</sub> oraz Bcl-2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma*) [48]. Wymienione proteiny hamują apoptozę indukowaną przez wydzielanie wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  z ER oraz blokują uwalnianie cytochromu c i czynnika AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) do cytoplazmy. W efekcie prowadzi to do inaktywacji kaspazy 3 i 9 oraz do braku degradacji lamininy. W komórkach raka stercza niewrażliwych na terapię hormonalną stwierdzono też zwiększoną ekspresję kinazy IKK (ang. *IκB kinase*), wpływającej na wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB (ang. *nuclear factor κB*) [22]. Czynnikiem ten jest regulatorem funkcji wielu białek przeżycia, takich jak: TRAF-1, TRAF-2 (ang. *TNF-R-associated factor*), Bcl-2, czy IAP (ang. *inhibitory apoptosis protein*). Oprócz funkcji antyapoptotycznych wpływa on także na proces angiogenezy i na inwazję komórek nowotworowych, powodując wzrost transkrypcji genów IL-8, VEGF oraz metaloproteinaz [24]. Z progresją nowotworową związany jest także wzrost aktywności kinazy Akt hamującej apoptozę poprzez inaktywację białek Bad (ang. *Bcl-2 antagonist of cell death*) i kaspazy 9. Podwyższony poziom mRNA białka Akt obserwuje się w komórkach PC3 i DU145. Aktywacja drogi sygnałowej prowadzącej poprzez kinazy PI3K (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i Akt prowadzi do inaktywacji genów w receptorach AR [24].

Zahamowanie apoptozy w komórkach raka gruczołu krokowego może być również związane z inaktywacją czynników supresorowych: PTEN, p53, Bin1 oraz PAR4. Jednym z wiodących regulatorów cyklu komórkowego, apoptozy i różnicowania jest p53, którego brak lub mutacje prowadzą w komórkach PC3 i DU145 do nadmiernej proliferacji oraz hormonooporności [49]. Czynnikiem ten powoduje wzrost aktywności



genów p21/WAF 1, bax fas/apo1, co prowadzi do zahamowania apoptozy [25]. W komórkach PC3 i DU145 obserwuje się też zredukowaną ekspresję supresora Bin 1, który hamuje transformację nowotworową poprzez oddziaływania z czynnikiem c-myc. Bin 1 wpływa na apoptozę niezależną od kaspaz, tj. na obkurczanie komórki, wakuolizację cytoplazmy i degradację DNA. Jest on również induktorem śmierci komórek nowotworowych, w których amplifikowany jest czynnik c-myc [24].

W przypadku komórek LNCaP, których wzrost zależy od hormonów płciowych, ogólny mechanizm apoptozy jest podobny, zaobserwowano jednak pewne różnice dotyczące początkowego etapu procesu [48].

Na przebieg apoptozy w komórkach raka stercza ma także wpływ czynnik wzrostu TGF- $\beta$ 1. Hamuje on wzrost komórek nowotworowych głównie pochodzenia nabłonkowego poprzez wpływ na poziom inhibitorów cyklin p15, p21 oraz p27. Komórki raka gruczołu krokowego (PC3, DU145) unikają apoptozy indukowanej przez TGF- $\beta$ 1 poprzez utratę funkcjonalnych receptorów dla tego czynnika [5].

## PODSUMOWANIE

Na podstawie prac omówionych w tym artykule można stwierdzić, że wyniki badań *in vitro*, przeprowadzanych przez ostatnie lata nad rakiem stercza, w znacznym stopniu przybliżają nas do poznania molekularnego mechanizmu powstawania przerzutów. Jednak liczne aspekty tego procesu pozostają niewyjaśnione i wymagają dalszych badań.

## LITERATURA

- [1] ALBELDA S. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; **68**: 4–17.
- [2] ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Cells junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. Molecular biology of the cell. New York, London: Garland 1994: 995–999.
- [3] ALBRECHT M, RENNEBERG M, WENNEMUTH G, MOSCHER O, JANSEN M, AUMULLER G, KONRAD L. Fibronectin in human prostatic cells *in vivo* and *in vitro*: expression, distribution, and pathological significance. *Histochem Cell Biol* 1999; **112**: 51–61.
- [4] ANGELUCCI A, FESTUCCIA C, GRAVINA GL, MUZZI P, BONGHI L, VICENTINI C, BOLOGNA M. Osteopontin enhances the cell proliferation induced by the Epidermal Growth Factor in human prostate cancer cells. *Prostate* 2004; **59**: 157–166.
- [5] BARRACK ER. TGF- $\beta$  in prostate cancer: a growth inhibitor that can enhance tumorigenicity. *Prostate* 1997; **30**: 61–70.
- [6] BIGGERSTAFF JP, SETH N, AMIRKHOSRAVI A, AMAYA M, FAOGARTY S, MEYER TV, SIDDIQUI F, FRANCIS JL. Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence *in vitro* and *in vivo*, and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1999; **17**: 723–730.
- [7] BUSSEMAKERS MJG, van BOKHOVEN A, TOMITA K, JANSEN CFJ, SCHALKEN JA. Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2000; **85**: 446–450.
- [8] CONNOLLY JM, ROSE DP. Autocrine regulation of DU145 human prostate cancer cell growth by epidermal growth factor-related polypeptides. *Prostate* 1991; **19**: 173–180.
- [9] COOPER CR, CHAY CH, GENDERNALIK JD, LEE HL, BHATIA J, TAICHMAN RS, McCAULEY LK, KELLER ET, PIENTA JK. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* 2003; **97**: 739–747.

- [10] COOPER CR, PIENIA KJ. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000; **3**: 6–12.
- [11] COOPER CR, McLEAN L, WALSH M, TAYLOR J, HAYASAKA S, BHATIA J, PIENIA KJ. Preferential adhesion of prostate cancer cells to bone is mediated by binding to bone marrow endothelial cells as compared to extracellular matrix components *in vitro*. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 4839–4847.
- [12] COOPER CR, BHATIA J, MUENCHEN HJ, McLEAN L, HAYASAKA S, TAYLOR J, PONCZA PJ, PIENIA JK. The regulation of prostate cancer cell adhesion to human bone marrow endothelial cell monolayers by androgen dihydrotestosterone and cytokines. *Clin Exp Metastasis* 2002; **19**: 25–33.
- [13] DE S, CHEN J, NARIZHEVA NV, HESTON W, BRAINARD J, SAGE EH, BYZOVA TV. Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* 2003; **278**: 39044–39050.
- [14] DIMITROFF CJ, LECHPAMMER M, LONG-WOODWARD DL, KUTOK JL. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res* 2004; **64**: 5261–5269.
- [15] DIMITROFF CJ, DESCHENY L, TRUJILO N, KIM R, NGUYEN V, HUANG W, PIENIA K J, KUTOK JL, RUBIN MA. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 5750–5760.
- [16] DOROBK W. Zagadnienia endokrynologiczne. W: Choroby gruczołu krokowego. Borkowski A, Borówka A (red.) PZWL Warszawa: 1997: 35–40.
- [17] EDWARDS J, BARTLETT JMS. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: modifications to the androgen receptor. *BJU Int* 2005; **95**: 1320–1326.
- [18] FELDING-HABERMANN B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003; **20**: 203–213.
- [19] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 4–6.
- [20] FORNARO M, MANES T, LANGUINO LR. Integrins and prostate cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev* 2001; **20**: 321–331.
- [21] FREEMAN KW, GANGULA RD, WELM BE, OZEN M, FOSTER BA, ROSEN JM, ITTMAN M, GREENBER NM, SPENCER DM. Conditional activation of Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 1, but not FGFR2, in prostate cancer cells leads to increased osteopontin induction, extracellular signal-regulated kinase activation, and *in vivo* proliferation. *Cancer Res* 2003; **63**: 6237–6243.
- [22] GASPARIAN AV, YAO YJ, KOWALCZYK D, LYAKH L, KARSELADZE A, SLAGA TJ, BUDUNOVA I. The role of IKK in constitutive activation of NF- $\kappa$ B transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002; **115**: 141–151.
- [23] GLINSKY VV, GLINSKY GV, RITTENHOUSE-OLSON K, HUFLEJT F E, GLINSKII OV, DEUTSCHER VL, QUINN TP. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res* 2001; **61**: 4851–4857.
- [24] GURUMURTHY S, VASUDEVAN K M, RANGNEKAR VM. Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2001; **20**: 225–243.
- [25] HARA I, MIYAKE H, HARE S, ARAKAWA S, KAMIDONO S. Differential involvement of the Fas receptor/ligand system in p53-dependent apoptosis in human prostate cancer cells. *Prostate* 2000; **45**: 341–349.
- [26] HOBISCH A, HITTMAIR A, DAXENBICHLER G, WILLE S, RADMAYR C, HOBISCH-HAGEN P, BARTSCH G, KLOCKER H, CULIG Z. Metastatic lesions from prostate cancer do not express oestrogen and progesterone receptors. *J Pathol* 1997; **182**: 356–361.
- [27] HOROSZEWICZ JS, LEONG SS, CHU TM, WAJSMAN ZL, FRIEDMAN M, PAPSIDERO L, KIM U, CHAI LS, KAKATI S, ARYA S K, SANDBERG AA. The LNCaP cell line a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 1980; **37**: 115–132.
- [28] HORVATH LG, HENSCHALL SM, LEE C-S, HEAD DR, QUINN DI, MAKELA S, DELPRADO W, GOLOVSKY D, BRENNER PC, O'NEILL G, KOONER R, STRICKER P D, GRYGIEL JJ, GUSTAFSSON JA, SUTHERLAND RL. Frequent loss of estrogen receptor- $\beta$  in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 5331–5335.
- [29] HORVATH LG, HENSCHALL SM, LEE C-S, KENCH JG, GOLOVSKY D, BRENNER PC, O'NEILL G, KOONER R, STRICKER PD, GRYGIEL JJ, SUTHERLAND RL. Lower levels of nuclear  $\beta$ -catenin predict for a poorer prognosis in localized prostate cancer. *Int J Cancer* 2005; **113**: 415–422.



- [30] HYNES RO. Integrins: versatility, modulation and cell adhesion. *Cell* 1992; **69**: 11–25.
- [31] JACOB K, WEBBER M, BENAYAHU D, KLEINMAN HK. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Res* 1999; **59**: 4453–4457.
- [32] JAVIDAN J, DEITICH AD, Shi X-B, de VERE WHITE RW. The androgen receptor and mechanisms for androgen independence in prostate cancer. *Cancer Invest* 2005; **23**: 520–528.
- [33] JEMAL A, TIWARI RC, MURRAY T, GHAFOR A, SAMUEL SA, WARD E, FEUER EJ, THUN MJ. Cancer Statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; **54**: 8–29.
- [34] KAIGHN ME, NARAYAN S, OHNUKI Y, LECHNER JF, JONES LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3). *Investig Urol* 1979; **17**: 16–23.
- [35] KAWIAK J. Czy biologia molekularna może być pomocna w pracy lekarza urologa? W: Borówka A. Wykłady z urologii. Warszawa: Polskie Towarzystwo Urologiczne 2001: 123–125.
- [36] KELLER ET, ZHANG J, COOPER CR, SMITH PC, McCAULEY LK. Prostate carcinoma skeletal metastases: cross-talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev* 2001; **20**: 333–349.
- [37] KONIG JE, SENEGE T, ALLHOFF EP, KONIG W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Prostate* 2003; **58**: 121–129.
- [38] KRIEGER JN, ROSS SO, RILEY DE. Chronic prostatitis: epidemiology and role of infection. *Urology* 2002; **60**(6A): 8–12.
- [39] KWABI-ADDO B, OZEN M, ITTMAN M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2004; **11**: 709–724.
- [40] LAU K-M, LASPINA M, LONG J, HO S-M. Expression of estrogen receptor (ER)- $\alpha$  and ER- $\beta$  in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res* 2000; **60**: 3175–3182.
- [41] MADEJA Z, MIĘKUS J, SROKA J, DJAMGOZ MBA, KOROHODA W. Homotypic cell-cell contacts stimulate the motile activity of rat prostate cancer cells. *BJU Int* 2001; **88**: 776–786.
- [42] MEYER T, HART IR. Mechanism of tumour metastasis. *Eur J Cancer* 1998; **34**: 214–221.
- [43] MIĘKUS K, CZERNIK M, SROKA J, CZYŻ J, MADEJA Z. Contact stimulation of prostate cancer cell migration: the role of gap junctional coupling and migration stimulated by heterotypic cell-to-cell contacts in determination of the metastatic phenotype of Dunning rat prostate cancer cells. *Biol Cell* 2005; **97**: 893–903.
- [44] MURPHY-ULLRICH JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 2001; **107**: 785–790.
- [45] OKEGAWA T, LI Y, PONG RC, HSIEH JT. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* 2002; **167**: 1836–1843.
- [46] ORR FW, WANG HH, LAFRENIE RM, SCHERBARTH S, NANCE DM. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol* 2000; **190**: 310–329.
- [47] PAGET S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; **1**: 571–573. zob. WEISS L. Patterns of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; **19**: 281–301.
- [48] PINSKI J, DORFF TB. Prostate cancer metastases to bone: pathophysiology, pain management and the promise of targeted therapy. *Eur J Cancer* 2005; **41**: 932–940.
- [49] QUINN DI, HENSHALL SM, SUTHERLAND RL. Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 2005; **41**: 858–887.
- [50] ROKHLIN OW, COHEN MB. Expression of cellular adhesion molecules on human prostate tumor cell lines. *Prostate* 1995; **26**: 205–212.
- [51] ROMANOV VI, WHYARD T, ADLER HL, WALTZER WC, ZUCKER S. Prostate cancer cell adhesion to bone marrow endothelium: The role of prostate-specific antigen. *Cancer Res* 2004; **64**: 2083–2089.
- [52] SAIKI J. Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn J Pharmacol* 1997; **75**: 215–242.
- [53] SAMSSEL L, ZAIDEL G, DRUMGOOLE HM, JELOVAC D, DRACHENBERG C, RHEEJ G, BRODIE MH, BIELAWSKA A, SMYTH MJ. The ceramide analog, B13 induces apoptosis in prostate cancer cell lines and inhibits tumor growth in prostate cancer xenografts. *Prostate* 2004; **58**: 382–393.
- [54] SCHWARTZ K, DESCHERE B, XU J. Screening for prostate cancer: Who and how often? *J Fam Pract* 2005; **54**: 586–596.
- [55] SCHWARTZ MA, GINSBERG MH. Networks and crosstalk: integrin signaling spreads. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 1465–1476.
- [56] SCOTT LJ, CLARKE NW, GEORGE NJ, SHANKS JH, TESTA NG, LANG SH. Interactions of human prostatic epithelial cells with bone marrow endothelium: binding and invasion. *Br J Cancer* 2001; **84**: 1417–1423.

- [57] SOBEL RE, SADAR MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines – Part 1. *J Urol* 2005; **173**: 342–359.
- [58] STEWART DA, COOPER CR, SIKES RA. Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Rep Biol Endocrinol* 2004; **2**: 2–15.
- [59] STONE KR, MICKEY DD, WUNDERLI H, MICKEY GH, PAULSON DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). *Int J Cancer* 1978; **21**: 274–281.
- [60] TAKEICHI M. Cadherin Cell Adhesion Receptors as a Morphogenetic Regulator. *Science* 1991; **251**: 1451–1455.
- [61] TOMITA K, van BOKHOVEN A, van LEENDERS GJLH, RUIJTER ETG, JANSEN CFJ, BUSSEMAKERS MJG, SCHALKEN JA. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 2000; **60**: 3650–3654.
- [62] TOMITA K, van BOKHOVEN A, JANSEN CFJ, BUSSEMAKERS MJG, SCHALKEN JA. Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell–cell contacts by  $\alpha$ -catenin. *Biochem Biophys Res Commu* 2000; **267**: 870–874.
- [63] TRAN NL, NAGLE RB, CRESS AE, HEIMARK RL. N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1999; **155**: 787–798.
- [64] TRIKHA M, RASO E, CAI Y, FAZAKAS Z, PAKU S, PORTER AT, TIMAR J, HONN KV. Role of  $\alpha_{11b}\beta_3$  integrin in prostate cancer metastasis. *Prostate* 1998; **35**: 185–192.
- [65] UNTERGASSER G, MADERSBACHER S, BERGER P. Benign prostatic hyperplasia: age related tissue-remodeling. *Exp Geront* 2005; **40**: 121–128.
- [66] WANG X, FERREIRA AM, SHAO Q, LAIRD DW, SANDIG M.  $\beta_3$  integrins facilitate matrix interactions during transendothelial migration of PC3 prostate tumor cells. *Prostate* 2005; **63**: 65–80.
- [67] WEBBER MM, BELLO D, QUADER S. Immortalized epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic Cell Lines. *Prostate* 1997; **30**: 58–64.
- [68] YAMAGUCHI H, WYCKOFF J, CONDEELIS J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 559–564.
- [69] YONEDA T. Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone. *Eur J Cancer* 1998; **34**: 240–245.
- [70] ZHENG DQ, WOODARD AS, TALLINI G, LANGUINO LR. Substrate Specificity of  $\alpha_{v}\beta_3$  Integrin – mediated cell migration and Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT Pathway activation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 24565–24574.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 02.02. 2006 r.

Przyjęto: 07.04. 2006 r.

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa.

e-mail: hmkowal@cmkp.edu.pl

biofmat@cmkp.edu.pl



## FUZJA PREKURSORÓW OSTEOKLASTÓW ORAZ REGULACJA AKTYWNOŚCI OSTEOKLASTÓW DOJRZAŁYCH\*

OSTEOCLAST PRECURSOR CELL FUSION AND REGULATION  
OF MATURE OSTEOCLASTS' ACTIVITY

Krzysztof H. WŁODARSKI, Paweł WŁODARSKI

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Centrum Biostruktury Akademii Medycznej  
w Warszawie

*Streszczenie:* Powstawanie osteoklastów – osteoklastogeneza – jest procesem tworzenia wielojądrowych komórek zdolnych do resorbowania macierzy kostnej podlegającym precyzyjnej regulacji licznymi ścieżkami sygnałowymi. Fusja wywodzących się ze szpiku makrofagów, kontrolowana cytokinami oraz ligandami uwalnianymi lub ekspozowanymi przez komórki kościotwórcze – osteoblasty – prowadzi do powstania wielojądrzastych osteoklastów. Omówiono strukturę i funkcję tych komórek oraz przedstawiono wpływ czynników osteotropowych, cytokin i niektórych stanów patologicznych na proces powstawania tych komórek i ich aktywności.

*Słowa kluczowe:* makrofagi, oddziaływanie osteoblast/osteoklast, osteoklastogeneza, osteoklast.

*Summary:* Osteoclastogenesis – formation of polynuclear cells capable to resorb bone matrix, is tightly regulated by the number of signaling pathways. Fusion of bone marrow-derived macrophages, controlled by cytokines and osteoblast-bound ligands, leads eventually to formation of osteoclast. The structure of this cell and its function are discussed. Effects of drugs, cytokines and certain clinical conditions on formation of osteoclasts are reviewed in this paper.

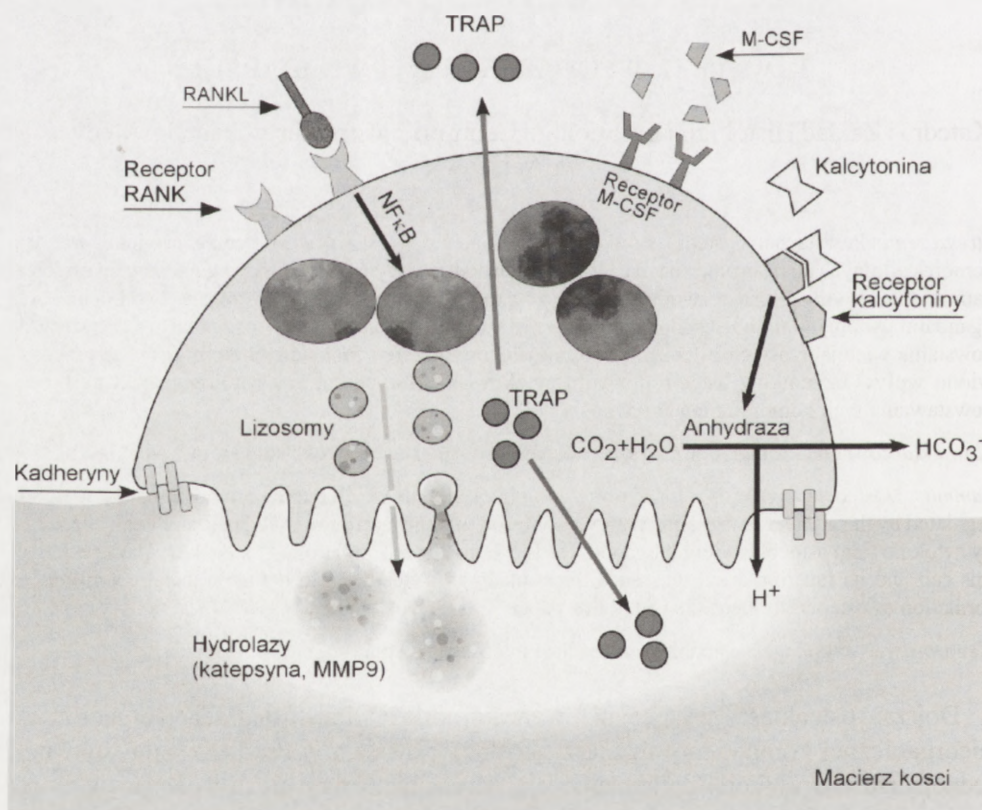
*Key words:* macrophages, osteoblasts/osteoclast interplay, osteoclastogenesis, osteoclast.

Dojrzałe osteoklasty, wyspecjalizowane komórki zdolne do degradacji organicznej i nieorganicznej komponenty macierzy kostnej, powstają w drodze zlania się (fuzji) jednojądrzastych komórek prekursorowych. Mechanizmy fuzji nie są w pełni wyjaśnione, a ich poznanie pozwoli na interweniowanie w proces osteoklastogenezy, a pośrednio w procesy resorpcji kości, tak ważne z uwagi na epidemiczne rozmiary osteoporozy.

\*Praca wykonana w ramach grantu Akademii Medycznej 1M15/W2/06.

Dojrzałe osteoklasty są dużymi komórkami wielojądrzastymi. W odróżnieniu od komórek ciała obcych, również wielojądrzastych, które powstają w niektórych typach reakcji zapalnych, osteoklasty są zdolne do resorbowania organicznej macierzy kostnej po jej uprzedniej demineralizacji poprzez wydzielanie protonów i jonów chloru. Osteoklast wyposażony jest więc w zestaw enzymów hydrolitycznych oraz w system, pozwalający na uwalnianie jonów chlorowych i wodorowych (przegląd [48]). Po wypłukaniu części nieorganicznej, którą stanowi hydroksyapatyt maskujący macierz organiczną, enzymy hydrolityczne mogą trawić elementy organiczne kości.

Uwalnianie jonów wodorowych oraz enzymów hydrolitycznych przez osteoklasty odbywa się w biegunie komórki przylegającym do resorbowanej kości, z którą łączy się na obrzeżu za pomocą receptorów dla witronektyny [25]. Na tym biegunie występuje system wypukleń błony komórkowej, zwany rąbkami koronkowym. Białka adhezyjne łączące się z sekwencjami RGD witronektyny macierzy kości uszczelniają styk osteoklastu z podłożem, umożliwiając miejscowe działanie uwalnianych drogą egzocytozy



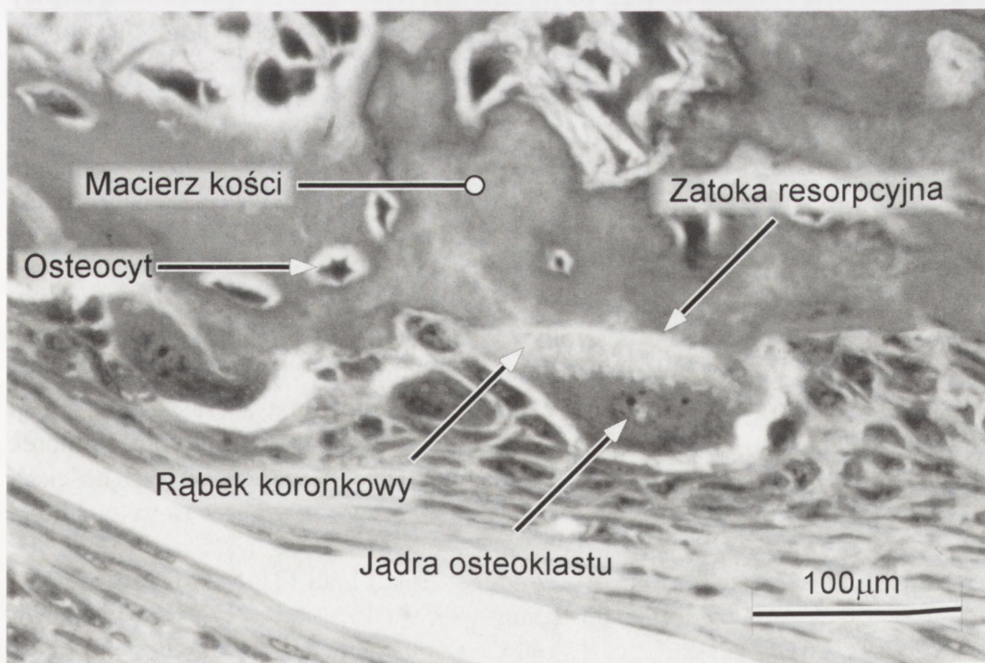
RYCINA 1. Schemat dojrzałego osteoklastu resorbującego macierz kostną. Opis mechanizmów oddziaływania wymienionych czynników zamieszczony jest w tekście



pęcherzyków lizosomalnych, zawierających enzymy proteolityczne (ryc. 1) [2, 47]. W polaryzację dojrzałych osteoklastów zaangażowanych jest szereg cząsteczek sygnałowych (przegląd [47]). Morfologicznym wyrazem aktywności osteoklastycznej jest powstawanie od strony rąbka koronkowego ubytków macierzy kostnej, zwanych zatokami resorpcyjnymi (ryc. 2).

Oprócz obecności receptorów dla witronektyny, dojrzałe osteoklasty mają receptory dla czynnika wzrostu monocytów – M-CSF, dla kalcytoniny [25] oraz receptor RANK dla cytokiny RANK-L (ligand dla receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B – NFκB). Oprócz ekspresji receptora RANK dojrzałe osteoklasty charakteryzuje wysoka ekspresja transbłonowego białka DC-STAMP (ang. *dendritic cell specific transmembrane protein*), proteiny specyficznej dla komórek dendrytycznych – jednej z postaci makrofagów. Osteoklasty charakteryzuje ponadto wysoka aktywność fosfatazy zasadowej winiano-opornej (ang. *tartrate resistant alkaline phosphatase*, TRAP), katepsyny K oraz metaloproteinazy MMP-9 [31]. Istnieje wiele godnych polecenia prac przeglądowych, poświęconych biologii osteoklastów omawiających te procesy szerzej [2, 15, 47].

Prekursorowymi komórkami osteoklastów są wywodzące się ze szpiku komórki monocytarne. Dzięki pracom nad generowaniem osteoklastów *in vitro* ustalono, że występują one wśród populacji GM-CFU [9], nie ma ich jednak w koloniach M-CFU. Czysta postać komórek prekursorowych ma fenotyp CD-14 [35]. W warunkach hodowli osteoklastów *in vitro* komórki prekursorowe występują w populacji mononuklearnych



RYCINA 2. Dojrzały osteoklast resorbujący heterotopową bełeczkę kostną indukowaną u myszy przeszczepem ludzkich nabłonkowych komórek ustalonej linii WISH

komórek krwi obwodowej [21] lub pępowinowej [39], we krwi pacjentów z ostrą postacią szpiczaka [17], w makrofagach uzyskiwanych z tkanek patologicznych [40], objętych procesem nowotworowym lub zapalnym [4], z błony maziowej pacjentów z osteoarthritis, z guzów osteoklastoma [25, 56]. Najczęściej stosowanymi w badaniach *in vitro* źródłami komórek prekursorowych są komórki uzyskane ze szpiku lub śledziony [12]. Także ustalona mysia linia monocytarna, RAW 264.7 jest zdolna do różnicowania się w komórki osteoklastyczne [20, 57, 62]. Interesujące jest, że proliferacja komórek prekursorowych nie jest warunkiem koniecznym dla powstawania dojrzałych osteoklastów [9].

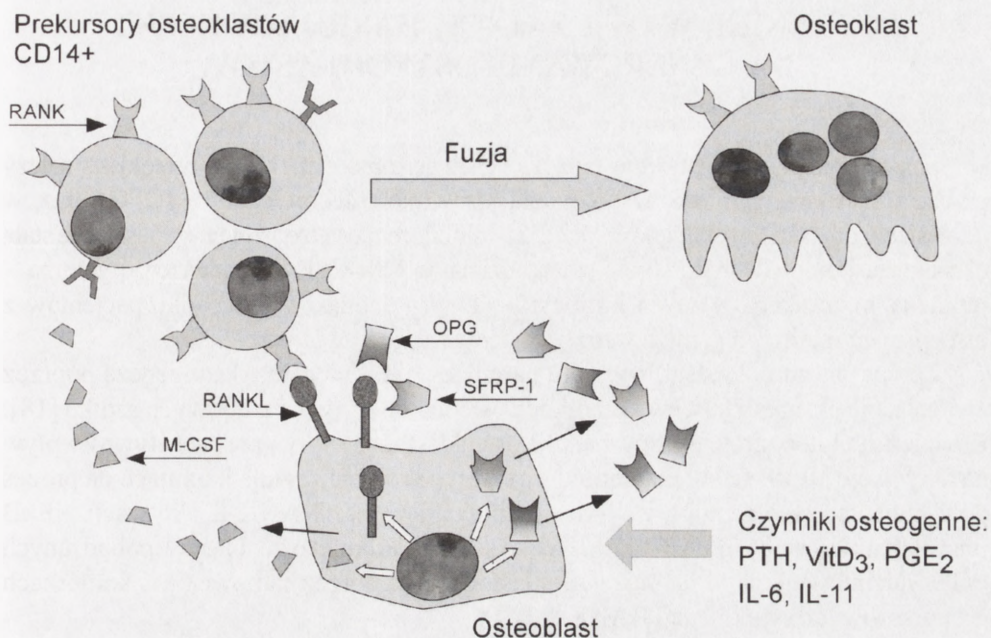
## AKTYWACJA DOJRZAŁYCH OSTEOKLASTÓW ORAZ POBUDZANIE OSTEOKLASTOGENEZY

Pomiędzy linią komórek osteoklastycznych a linią komórek kościotwórczych istnieje ścisłe powiązanie funkcjonalne (ryc. 3). Komórki osteoblastyczne, w tym komórki zrębowe szpiku, regulują aktywność osteoklastyczną za pomocą dwóch czynników. Po pierwsze, produkują ligand dla receptora RANK, który znajduje się na powierzchni osteoklastów. Jego pobudzenie poprzez związanie ligandu (RANK-L) uaktywnia NFκB, który transaktywuje szereg genów osteoklastu [1]. Drugim czynnikiem produkowanym przez osteoblasty jest osteoprotegeryna (OPG) – rozpuszczalny receptor-atrapa, mający powinowactwo do RANK-L (przeгляд [7, 43]). OPG współzawodniczy z receptorem RANK o RANK-L, antagonizując działanie RANK. OPG okazała się być opisanym wcześniej czynnikiem hamującym osteoklastogenezę – OCIF [60]. Związanie OPG z RANK-L uniemożliwia interakcję RANK/RANK-L, a więc nie dochodzi do aktywacji NFκB, a tym samym do aktywacji osteoklastu. Osteoprotegeryna jest więc czynnikiem przeciwdziałającym aktywacji osteoklastów. Podobne działanie wywiera też inny produkt aktywowanych osteoblastów – białko sFRP-1 (*secreted Frizzled-related protein*), także blokujące RANK-L [20]. Znanych jest wiele czynników, aktywujących osteoklasty i osteoklastogenezę. Są to deksametazon, który powoduje zahamowanie syntezy OPG, a wzrost ekspresji RANK-L w osteoblastach i komórkach zrębowych szpiku [44], witamina D3 [37, 53], czynnik martwicy nowotworów alfa (TNFα), którego działanie manifestuje się wzrostem ekspresji receptorów dla kalcytoniny, wzrostem ekspresji RANK oraz katepsyny K [28,38]. Ta ostatnia cytokina zwiększa również pulę komórek prekursorowych w organizmie [30]. TNF-alfa produkowany jest w znacznych ilościach w przebiegu reakcji zapalnych i to tłumaczy, dlaczego wielu procesom zapalnym towarzyszy resorpcja kości.

Inna cytokina – transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β) może również pobudzać osteoklasty przy braku dostępności RANK-L, ale jej wpływ na osteoklastogenezę zależy od czasu i długości trwania działania (patrz dalej).

Czynnik aktywujący kolonie granulocytarno-monocytaire (GM-CSF), produkowany m.in. przez komórki prekursorowe osteoklastów – monocyty, podany jednocześnie z





RYCINA 3. Udział osteoblastów w fuzji prekursorów osteoklastów (opis w tekście)

białkiem chemotaktycznym dla monocytów – MCP-1 prowadzi do powstawania wielojądrzastych osteoklastów bez udziału RANK-L. W obecności RANK-L krótkotrwała (2–48 godz.) ekspozycja GM-CSF aktywuje osteoklastogenezę, natomiast stała ekspozycja na GM-CSF prowadzi do generowania z prekursorów komórek dendrytycznych, zamiast osteoklastów [23].

Wpływ prostaglandyny PGE<sub>2</sub> na osteoklastogenezę u ludzi i u zwierząt bywa odmienny. Mysie makrofagi w obecności PGE<sub>2</sub> i RANK-L różnicują się w osteoklasty, natomiast wobec komórek ludzkich PGE<sub>2</sub> hamuje osteoklastogenezę.

Ostatnio dyskutowana jest rola receptorów purynergicznyc w osteoklastogenezie [3, 5, 6]. Nukleotyd ATP jest czynnikiem proresorpcyjnym i stwierdzono, że wolne nukleotydy aktywują w osteoblastach RANK-L [8, 13, 14, 22]. Jednym z lepiej poznanych receptorów purynergicznyc jest receptor P2X<sub>7</sub>, stanowiący błonowy kanał jonowy. Aktywacja tego receptora przez ATP prowadzi do wytworzenia porów w błonie komórkowej prekursorów osteoklastów. Aktywacja tych porów ma związek z fuzją komórek, gdyż blokada receptorów P2X<sub>7</sub> zapobiega osteoklastogenezie właśnie przez zapobieżenie fuzji [16].

W niniejszym przeglądzie nie dyskutujemy szczegółowo roli parathormonu (PTH) w aktywacji osteoklastów, gdyż temat ten jest zbyt szeroki, wykraczający poza ramy tego opracowania. PTH aktywuje osteoklasty poprzez zwiększanie ekspresji RANK-L na osteoblastach, które, w przeciwieństwie do osteoklastów, mają receptory dla PTH. Wpływ PTH na przebudowę kości nie jest jednak jednoznaczny; niskie dawki PTH działają pobudzająco na osteogenezę, wyższe – są czynnikiem proresorpcyjnym.

## CZYNNIKI WYWIERAJĄCE HAMUJĄCY EFEKT NA GENEROWANIE OSTEOKLASTÓW

Spośród czynników negatywnie regulujących fuzję komórek CD14<sup>+</sup> w osteoklasty należy przede wszystkim wymienić wspomnianą uprzednio osteoprotegerynę (OPG) oraz, w odniesieniu do ludzi, prostaglandynę E2 [52]. Inhibitorem osteoklastogenezy jest także stała ekspozycja komórek prekursorowych na działanie GM-CSF oraz interferon gamma – produkty m.in. aktywowanych limfocytów T [42]. Jednak w przypadku pacjentów z osteopetrozą interferon gamma wzmagą osteoklastogenezę *in vitro* [32].

Leptyna, hormon sytości, wywiera hamujący efekt na osteoklastogenezę poprzez zwiększanie ekspresji OPG w komórkach osteoblastycznych i zrębowych szpiku [18]. Również inhibitory proteasomów hamują osteoklastogenezę poprzez negatywny wpływ na aktywację NFκB [61]. Flawonoid kwercetyna również działa hamująco na proces powstawania osteoklastów w drodze hamowania przez RANK-L aktywacji NFκB oraz białka aktywującego AP-1 [57]. Białko sFRP-1, produkt osteoblastów pobudzanych PGE2 lub interleukiną 11 hamuje osteoklastogenezę poprzez hamowanie w komórkach prekursorowych sygnalizacji RANK-L [20].

## UDZIAŁ TGF-β W PROCESACH OSTEOKLASTOGENEZY

Ta cytokina jest bardzo silnym modulatorem osteoklastogenezy, wywierającym różne, przeciwstawne efekty, w zależności od sposobu jej podania [26]. Ekspozycja prekursorów CD14<sup>+</sup> na TGF-β przez krótki czas hodowli *in vitro* (1–7 dni) prowadzi do aktywacji osteoklastogenezy, mierzonej aktywności enzymu TRAP<sup>+</sup> i stopniem resorpcji matrycy kostnej. Jednakże ta sama cytokina, podawana przez cały czas hodowli (1–21 dni), wywiera efekt odwrotny – spadek liczby komórek TRAP<sup>+</sup>, spadek aktywności resorpcyjnej, spadek ekspresji enzymów hydrolitycznych – katepsyny K i metaloproteiny MMP-9. Ta stała ekspozycja TGF-β powoduje zahamowanie ekspresji receptora RANK. Stwierdzono również, że enzym MMP-9 może aktywować latentną formę TGF-β obecną w macierzy kostnej. Sugeruje się, że TGF-β ulega aktywacji przez MMP-9 pochodzącą z osteoklastów. TGF-β aktywuje w monocytach kinazę p38 MAPK, odpowiedzialną za chemotaksję i proliferację monocytów. Uwzględniając te dane postuluje się, że TGF-β pobudza osteoklastogenezę ludzkich monocytów w drodze stymulacji szlaku p38 MAPK, odpowiedzialnego za chemotaksję monocytów, dostarczając „materiału” dla przyszłych osteoklastów. Natomiast ciągła ekspozycja na TGF-β, hamując ekspresję RANK, wpływa negatywnie na osteoklastogenezę poprzez osłabienie sygnalizacji RANK/RANK-L.

TGF-β, przy braku RANK-L, a w obecności M-CSF pobudza monocyty do różnicowania się w kierunku komórek zdolnych do resorbowania macierzy kostnej, ale pozbawionych cech morfologicznych osteoklastów [24].



## FUZJA KOMÓREK PREKURSOROWYCH

Dojrzałe osteoklasty powstają w drodze fuzji komórek jednojądrzastych. Dokładny mechanizm fuzji komórek wielojądrzastych – osteoklastów i komórek olbrzymich ciał obcych nie zostały w pełni wyjaśnione, choć znanych jest wiele czynników, promujących lub hamujących ten proces. Cytokiny, transformujący czynnik wzrostu alfa (TGF- $\alpha$ ) oraz naskórkowy czynnik wzrostu EGF pobudzają proliferację komórek prekursorowych osteoklastów [50]. Na powierzchni makrofagów występują molekuly odpowiedzialne za fuzję: E-kadheryna [33] oraz antygen CD44 [55]. Udział w fuzji mają chemokiny: RANTES (ang. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted* – wydzielane przez aktywowane limfocyty T) oraz chemotaktyczne białko monocytów MCP-1 [27]. Dodanie tych chemokin do hodowli komórek prekursorowych pozwala na powstanie, przy braku w systemie RANK-L, wielojądrzastych komórek TRAP+, które jednak nie wykazują zdolności do resorbowania kości. Zdolność tę nabywają dopiero w obecności chemokiny MCP-1 oraz ligandu RANK-L.

Cyklosporyna A powodując w monocytach spadek ekspresji chemokiny MCP-1 hamuje sygnalizację RANK/RANK-L, ale dodanie do hodowli chemokin RANTES i MCP-1 prowadzi do różnicowania się osteoklastów TRAP+, zdolnych do resorbowania kości [36].

## CZYNNIKI PROMUJĄCE FUZJĘ PREKURSOROWYCH KOMÓREK OSTEOKLASTÓW

Celem uzyskania osteoklastogenezy w warunkach *in vitro* do środowiska hodowlanego musi być dodany czynnik wzrostu M-CSF oraz ligand (RANK-L) dla receptora RANK [23, 45, 47, 49, 51]. Ich niedostatek lub brak hamuje lub uniemożliwia fuzję i osteoklastogenezę *in vitro*.

Ostatnio stwierdzono, że fuzja prekursorów zachodzi przy udziale transbłonowego białka DC-STAMP [59]. Jest to, siedmiokrotnie przechodząca przez błonę komórkową pętla łańcucha białkowego, występującego w komórkach dendrytycznych – jednej z postaci makrofagów. Okazuje się, że bardzo wysoką ekspresję tego białka wykazują dojrzałe osteoklasty oraz komórki olbrzymie ciał obcych. Mutanty zwierząt, niezdolnych do syntezy tego białka, nie wytwarzają ani osteoklastów, ani komórek olbrzymich ciał obcych.

Na makrofagach, ulegających fuzji, opisano specyficzny, niezdefiniowany antygen 150 kD, nieobecny na makrofagach nieulegających fuzji, a przeciwciała monoklonalne wobec tego antygeny zapobiegają fuzji komórek [41]. Białko CD44 wiąże się z receptorem dla tych przeciwciał, tak więc cząsteczka CD44, a także CD47 biorą udział w fuzji komórek prekursorowych [54]. Także wewnątrzkomórkowa domena antygeny CD44 (CD44-ICD), odcinana w makrofagach, aktywuje w jądrze czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B, niezbędny dla aktywacji osteoklastów [10]. Za homotypową fuzję makrofagów odpowiedzialny jest receptor MRF (ang. *macrophage fusion receptor*),

dla którego ligandem jest cząsteczka CD47. Dzięki temu receptorowi makrofagi „rozpoznają” się przed fuzją. Rolę receptora purynergicznego P2X7 w fuzji prekursorów omówiono wyżej. Do czynników promujących fuzję zalicza się także zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów FGF- $\beta$  [62] oraz czynniki aktywujące fosfolipazę A2. Aktywacja tej niezależnej od jonów wapnia fosfolipazy powoduje w komórkach wzrost ekspresji markerów siateczki endoplazmatycznej (ER). Powstawanie komórek wielojądrzastych w drodze fuzji prekursorów ma wiele cech wspólnych z fagocytozą [34]. Fuzja makrofagów związana jest ze „stapianiem się” błony komórkowej jednego makrofaga z błoną drugiego. Występuje tu analogia do fagocytozy cząsteczek opsoninowanych (okrytych przeciwciałem). Polimeryzacja włókien aktynowych wokół tworzącego się fagosomu jest cechą nie tylko endocytozy, ale wszystkich rodzajów fagocytozy, a zahamowanie tej polimeryzacji, np. za pomocą cytochalazyny, całkowicie zapobiega fuzji makrofagów i wytwarzaniu wielojądrzastych komórek ciał obcych.

Fuzja makrofagów pod wpływem IL-4 odbywa się przy udziale receptorów mannozy, które są jednocześnie receptorami występującymi w procesach fagocytozy i endocytozy. Markery fagocytozy zachodzącej przy udziale retikulum endoplazmatycznego – calurexyna i calregulina – obecne są w makrofagach, ulegających fuzji i występują w większym stężeniu w miejscach zachodzącej fuzji błon. Markery te kolokalizują z miejscem wiązania Konkanawaliny A – lektyny wykazującej powinowactwo do mannozy. Może to sugerować, że podczas fuzji makrofagów siateczka endoplazmatyczna wykazuje ekspresję receptorów dla ligandu mannozy [34].

## **CZYNNIKI HAMUJĄCE FUZJĘ KOMÓREK PREKURSOROWYCH OSTEOKLASTÓW**

Oprócz osteoprotegeryny (OPG) oraz białka sFRP-1, czynnikami znacząco hamującymi wczesne etapy osteoklastogenezy są statyny – inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA) [46]. Geranylogeranylacja białek G (Rho, Rac) potrzebna jest we wczesnych etapach osteoklastogenezy [11]. Podanie statyn, np. Mevastatyny, zapobiega powstawaniu osteoklastów, ale ten hamujący efekt statyn znosi podanie związków szlaku cholesterolowego – mewalonianu, farnesylu i geranylogeranylu [58]. Zmniejszona synteza cholesterolu, będąca następstwem podania statyn, znacząco upośledza fuzję błon [29]. Także obniżony poziom LDL jest czynnikiem upośledzającym fuzję komórek.

Znajomość czynników regulujących fuzję komórek prekursorowych w osteoklasty, ich receptorów oraz czynników modulujących transdukcję wywołanego tymi ligandami sygnału, umożliwi ingerencję w mechanizmy prowadzące do patologicznej resorpcji kości. Poznane do tej pory i potencjalne, nowe cząsteczki, wpływające na ten proces, pozwolą w przyszłości na skuteczną terapię schorzeń związanych z zaburzoną funkcją osteoklastów.



## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABU-AMER Y, TONDRAVI MM. NF- $\kappa$ B and bone: the breaking point. *Nature Medicine* 1997; **3**: 1189–1190.
- [2] AMLING M, DELLING G. Zellbiologie des osteoklasten und molekulare Mechanismen der Knochenresorption. *Pathologie* 1996; **17**: 358–367.
- [3] ATHANASOU NA. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Jt Surg* 1996; **78-A**:1096–1111.
- [4] ATHANASOU NA, SABOKBAR A. Human osteoclast ontogeny and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 1999; **14**: 635–647.
- [5] BOWLER WB, BIRCH MA, GALLAGHER JA, BILBE G. Identification and cloning of human P2U purinoreceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1995; **10**: 1137–1145.
- [6] BOWLER WB, BUCKLEY KA, GARTLAND A, HIPSKIND RA, BILBE G, GALLAGHER JA. Extracellular nucleotide signaling: a mechanism for interacting local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone* 2001; **28**: 507–512.
- [7] BUCKLEY KA, FRASER WD. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 2002; **39**: 551–556.
- [8] BUCKLEY KA, HIPSKIND RA, GARTLAND A, BOWLER WB, GALLAGHER JA. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand. *Bone* 2002; **31**: 582–590.
- [9] CLOHISY DR, RAMNARAIN MLR. Osteoclast formation during tumor osteolysis does not require proliferating osteoclast precursor cells. *J Orthop Res* 1997; **15**: 301–306.
- [10] CUI W, KE JZ, ZHANG Q, CHALOUNI C, VINGERY A. The intracellular domain CD44 promotes the fusion of macrophages. *Blood* 2006; **107**: 796–805.
- [11] FISHER JE, ROGERS MJ, LUCKMAN SP, HUGHES DE, MASARACHIA PJ, WESOŁOWSKI G, RUSSELL RG, RODAN GA, RESZKA AA. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 133–138.
- [12] FULLER K, CHAMBERS TJ. Generation of osteoclasts in cultures of rabbit bone marrow and spleen cells. *J Cell Physiol* 1987; **132**: 441–452.
- [13] GALLAGHER JA, BUCKLEY KA. Expression and function of P2 receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; **2**: 432–439.
- [14] GALLAGHER JA. ATP P2 receptors and regulation of bone effector cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004; **4**: 125–127.
- [15] GARTLAND A, BUCKLEY KA, HIPSKIND RA, BOWLER WB, GALLAGHER JA. P2 receptors in bone – modulation of osteoclast formation and activity via P2X7 activation. *Critical Reviews in Eucariotic Gene Expression* 2003; **13**: 237–242.
- [16] GARTLAND A, BUCKLEY KA, BOWLER WB, GALLAGHER JA. Blockade of the pore-forming P2X7 receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 2003; **73**: 361–369.
- [17] GREGORETTI MG, BERGUIL L, ARAGNO M, CREMONA O, MARCHISIO PC, CALIGARIS-CAPPIO F. Osteoclast precursors circulate in the peripheral blood of patients with aggressive multiple myeloma. *Leukemia* 1995; **9**: 1392–1397.
- [18] HALLOWAY WR, COLLIER FM, AITKEN CJ, MYERS DE, HODGE JM, MALAKELLIS M, GOUGH TJ, COLLIER GR, NICHOLSON GC. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 2002; **17**: 200–209.
- [19] HATTERSLEY G, CHAMBERS TJ. Calcitonin receptors as markers for osteoclastic differentiation: correlation between generation of bone-resorptive cells and cells that express calcitonin receptors in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 1989; **125**: 1606–1612.
- [20] HAUSLER KD, HORWOOD NJ, CHUMAN Y, FISHER JL, ELLIS J, MARTIN TJ, RUBIN JS, GILLESPIE MT. Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res* 2004; **19**: 1873–1881.

- [21] HAYNES DR, ATKINS GJ, LORIC M, CROTTI TN, GEARY SM, FINDLAY DM. Bidirectional signaling between stromal and hemopoietic cells regulates interleukin-1 expression during human osteoclast formation. *Bone* 1999; **25**: 269–278.
- [22] HAYTON MJ, DILLON JP, GLYNN D, CURRAN JM, GALLAGHER JA, BUCKLEY KA. Involvement of adenosine 5'-triphosphate in ultrasound-induced fracture repair. *Ultrasound in Med & Biol* 2005; **31**: 1131–1138.
- [23] HODGE JM, KIRKLAND MA, ATIKEN CJ, WAUGH CM, MYERS DE, LOPEZ CM, ADAMS BE, NICHOLSON GC. Osteoclastic potential of human CFU-GM: biphasic effect of GM-CSF. *J Bone Miner Res* 2004; **19**: 190–199.
- [24] ITONAGA I, SABOKBAR A, SUN SG, KUDO O, DANKS L, FERGUSON D, FUJIKAWA Y, ATHANASOU NA. Transforming growth factor-beta induces osteoclast formation in the absence of RANKL. *Bone* 2004; **34**: 57–64.
- [25] JAMES IE, DODDS RA, LEE-RYKACZEWSKI E, EICHMAN CHF, CONNOR RD, HART TK, MALE-EFF BE, LACKMAN RD, GOWEN M. Purification and characterization of fully functional human osteoclast precursors. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 1608–1618.
- [26] KARSDAL MA, HJORTH P, HENRIKSEN K, KIRKEGAARD T, NIELSEN KL, LOU H, DELAISSE J-M, FOGED NT. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem* 2003; **278**: 44975–44987.
- [27] KIM MS, DAY CJ, MORRISON NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte-macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 16163–16169.
- [28] KOMINE K, KUKITA A, KUKITA T, OGATA Y, HOTOKEBUCHI T, KOHASHI O. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone* 2001; **28**: 474–483.
- [29] LEUGMAYR E, GLANTSCHNIG H, WESOŁOWSKI GA, GENTILE MA, FISHER JE, RODAN GA, RESZKA AA. Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ* 2004; **11** Suppl 1: S5–7.
- [30] LI P, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, MA L, LOONEY RJ, RITCHLIN CT, BOYCE BF, XING L. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11b high osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 265–276.
- [31] LITTLEWOOD-EVANS A, KOKUBO T, ISHIBASHI O, INAOKA T, WŁODARSKI B, GALLAGHER JA, BILBE G. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Bone* 1997; **20**: 81–86.
- [32] MADYASTHA PR, YANG S, RIES WL, KEY LL Jr. INF-gamma enhances osteoclast generation in cultures of peripheral blood from osteoprotective patients and normalizes superoxide production. *J Interferon Cytokine Res* 2000; **20**: 645–652.
- [33] MBALAVIELE G, CHEN H, BOYCE BF, MUNDY GR, YONEDA T. The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclasts from mononuclear precursors in murine marrow. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2757–2765.
- [34] McNALL AK, ANDERSON JM. Multinucleated giant cell formation exhibits feature of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp Mol Pathol* 2005; **79**: 126–135.
- [35] NICHOLSON GC, MALAKELLIS M, COLLIER FM, CAMERON PU, HOLLOWAY WR, GOUGHT TJ, GREGORIO-KING C, KIRKLAND MA, MYERS DE. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond)* 2000; **99**: 133–140.
- [36] PASSERI G, CARBONARE LD, GIANNINI S, MUSACCHIO E, CREPALDI G, SATORI L. Effects of cyclosporin A on osteoclasts and osteoblast progenitors from murine bone marrow. W: Papapoulos SE i wsp. [red.], Osteoporosis. 1996, Elsevier Science B.V. 1996: 61–66.
- [37] PHAROAH MJ, HEERSCHJE JN. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes an increase in the number of osteoclastlike cells in cat bone marrow cultures. *Calcif Tissue Int* 1985; **37**: 276–281.
- [38] QUINN JM, WHITTY GA, BYRNE RJ, GILLESPIE TM, HAMILTON JA. The generation of highly enriched osteoclast-lineage cell populations. *Bone* 2000; **30**: 164–170.
- [39] QUINN JM, FUJIKAWA Y, MCGEE JO, ATHANASOU NA. Rodent osteoblast-like cells support osteoclastic differentiation of human cord blood monocytes in the presence of M-CSF and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 173–179.
- [40] SABOKBAR A, FUJIKAWA Y, NEALE S, MURRAY D, ATHANASOU N. Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. *Ann Rheum Dis* 1997; **56**: 414–420.



- [41] SAGINARIO C, QIAN HY, VIGNERY A. Identification of an inducible surface molecule specific to fusing macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1210–1214.
- [42] SHINODA K, SUGIYAMA E, TAKI H, HARADA S, MINO T, MARUYAMA M, KOBAYASHI M. Resting T cells negatively regulate osteoclast generation from peripheral blood monocytes. *Bone* 2003; **33**: 711–720.
- [43] SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLY M, CHANG M-S, LUTHY R, NGUYEN HQ, WOODEN S, BENNETT L, BOONE T, SHIMAMOTO G, DEROSE M, ELLIOTT R, COLOMBERO A, TAN H-L, TRAIL G, SULLIVAN J, DAVY E, BUCAY N, RENSHAW-GEGG L, HUGHES TM, HILL D, PATTISON W, CAMPBELL P, SANDER S, VAN G, TARPLEY J, DERBY P, LEE R, AMGEN EST PROGRAM, BOYLE WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309–319.
- [44] SIVAGURUNATHAN S, MUIR MM, BRENNAN TC, SEALE JP, MASON RS. Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 390–398.
- [45] SCHEVEN BAA, MILNE JS, ROBINS SP. A novel culture system to generate osteoclasts and bone resorption using porcine bone marrow cells: role of M-CSF. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **231**: 231–235.
- [46] STAAL A, FRITH JC, FRENCH MH, SWARTZ J, GUNGOR T, HARRITY TW, TAMASI J, ROGERS MJ, FEYEN JH. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res* 2003; **18**: 88–96.
- [47] SUDA T, NAKAMURA I, JIMI E, TAKAHASHI N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 869–879.
- [48] SUDA T, TAKAHASHI N, MATRIN TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* 1992; **13**: 66–80.
- [49] SUSA M, LOUNG-NGUYEN N-H, CAPPELLEN D, ZAMUROVIC N, GAMSE R. Human primary osteoclasts: *in vitro* generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transitional Med* 2004; **2**: 6.
- [50] TAKAHASHI N, MACDONALD BR, HON J, WINKLER ME, DERYNCK R, MUNDY GR, ROODMAN GD. Recombinant human transforming factor- $\alpha$  stimulates the formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *J Clin Invest* 1986; **78**: 894–898.
- [51] TAKAMI M, WOO JT, NAGAI K. Osteoblastic cells induce fusion and activation of osteoclasts through a mechanism independent of macrophage-colony-stimulating factor production. *Cell Tissue Res* 1999; **298**: 327–334.
- [52] TAKE I, KOBAYASHI Y, YAMAMOTO Y, TSUBOIH, OCHI T, UEMATSU S, OKAFUJI N, KURIHARA S, UDAGAWA N, TAKAHASHI N. Prostaglandin E2 strongly inhibits human osteoclast formation. *Endocrinology* 2005; **146**: 5204–5214.
- [53] Van't HOF RJ, TUINENBURG-BOLL RAAP AC, NIJWEIDE PJ. Induction of osteoclast characteristics in cultured avian blood monocytes; modulation by osteoblasts and 1,25-(OH) $_2$ vitamin D3. *Int J Exp Pathol* 1995; **76**: 205–214.
- [54] VIGNERY A. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 2000; **81**: 291–304.
- [55] deVRIES TJ, SCHOENMAKER T, BEERSTEN W, van der NEUT R, EVERTS V. Effect of CD44 deficiency on *in vitro* and *in vivo* osteoclast formation. *J Cell Biochem* 2005; **94**: 954–966.
- [56] WALSH CA, CARRON JA, GALLAGHER JA. The isolation of osteoclasts from human giant cell tumors and long-term marrow cultures. W: GE Jones [red.] *Methods in molecular medicine: human cell culture protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996: 263–274.
- [57] WATTEL A, KAMEL S, PROUILLET C, PETIT JP, LORGET F, OFFORD E, BRAZIER M. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via mechanism involving NF kappa B and AP-1. *J Cell Biochem* 2004; **92**: 285–295.
- [58] WOO JT, NAKAGAWA H, KRECIC AM, NAGAI K, HAMILTON AD, SEBTI SM, STERN PH. Inhibitory effects of mevastatin and a geranylgeranyl transferase I inhibitor (GGTI-2166) on mononuclear osteoclast formation induced by receptor activator of NF kappa B ligand (RANKL) or tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). *Biochem Pharmacol* 2005; **69**: 87–95.
- [59] YAGI M, MIYAMOTO T, SAWATAMI Y, IWAMOTO K, HOSOGANE N, FUJITA N, MORITA K, NINOMIYA K, SUZUKI T, MIYAMOTO K, OIKE Y, TAKEYA M, TOYAMA Y, SUDA T. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 2005; **202**: 345–351.

- [60] YASUDA H, SHIMA N, NAKAGAWA N, MOCHIZUKI S-I, YANO K, FUJISE N, SATO Y, GOTO M, YAMAGUCHI K, KURIYAMA M, KANNO T, MURAKAMI A, TSUDA E, MORINAGA T, HIGASHIO K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 1998; **139**: 1329–1337.
- [61] ZAVARSKI I, KREBBEL H, WILDEMANN B, HEIDER U, KAISER M, POSSINGER K, SEZER O. Proteasome inhibitors abrogate osteoclast differentiation and osteoclast function. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; **333**: 200–205.
- [62] ZUO J, JIANG J, DOLCE C, HOLLIDAY LS. Effects of basic fibroblast growth factor on osteoclasts and osteoclasts-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **318**: 162–167.

*Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz*

*Otrzymano: 21.02. 2006 r.*

*Przyjęto: 14.04.2006 r.*

*02-004 Warszawa, Chalubińskiego 5*



## ROŚLINNE METALOTIONEINY\*

### PLANT METALLOTHIONEINS

Anna Maria KOSZUCKA, Grażyna DĄBROWSKA

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

*Streszczenie:* Metalotioneiny to niskocząsteczkowe białka bogate w reszty cysteinowe, zdolne do wiązania metali ciężkich. Występują u niektórych *Prokaryota*, grzybów, roślin i zwierząt. Próby wyizolowania natywnych białek roślinnych były zazwyczaj nieudane, jednak u wielu roślin jedno- i dwuliściennych, a także u niektórych nagonasiennych i glonów zidentyfikowano geny kodujące metalotioneiny. Podobnie jak u zwierząt tworzą one małe rodziny genów, a ich ekspresja jest indukowana różnymi czynnikami endo- i egzogennymi, w tym jonami metali. Jednak w przeciwieństwie do zwierzęcych homologów nie tworzą one zgrupowań na jednym chromosomie, ale są rozproszone w genomie. Większość metalotionein roślinnych ulega ekspresji tkankospecyficzej. Sugeruje się, że roślinne metalotioneiny uczestniczą w homeostazie metali niezbędnych do życia i detoksykacji szkodliwych jonów metali oraz chronią tkanki przed stresem oksydacyjnym.

*Słowa kluczowe:* jony metali, detoksyfikacja, stres oksydacyjny.

*Summary:* Metallothioneins are low molecular weight, cysteine-rich, heavy-metal binding proteins. They are present in some *Prokaryota*, fungi, plants and animals. Attempts to isolate native plant proteins failed but many metallothionein genes were identified in mono- and dicotyledons and also in some gymnosperms and algae. They are organised in small gene families, like in animals genomes and their expression is upregulated by different endo- and exogenous factors, including metal ions. In contrast to animal metallothionein genes, they don't form clusters, but they are distributed through plant genomes. Furthermore expression most of them is organspecific. It was suggested that plant metallothioneins may be involved in essential metal ion homeostasis and metal ion detoxification, they could also protect tissues against oxidative stress.

*Key words:* metal ions, detoxification, oxidative stress.

\*Praca częściowo finansowana z funduszu Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.

## WPROWADZENIE

Metalotioneiny to białka o niskiej masie cząsteczkowej (4–8 kDa) i dużej zawartości reszt cysteinowych, wiążące koordynacyjnie jony metali – stąd właśnie nazwa tych białek [2, 7, 9, 47]. Pierwszy raz terminu metalotioneina użyli w 1957 roku Margoshes i Vallee, dla opisanego białka wyizolowanego z kory nerki konia, które zawierało duże ilości kadmu i siarki [60].

TABELA 1. Charakterystyka metalotionein, podział wg [60]

Klasa	Cechy	Występowanie
I	20 reszt cysteinowych w konserwatywnych pozycjach w obrębie całego łańcucha białkowego, brak aminokwasów aromatycznych, cząsteczka białka związa się w dwie domeny wiążące metale oddzielone od siebie krótkim odcinkiem aminokwasowym [19]	u niektórych grzybów, np. u <i>Neurospora crassa</i> i pieczarki dwuzarodnikowej, rozpowszechnione u zwierząt kręgowych, zwłaszcza u saków
II	struktura pierwszorzędowa, zwłaszcza rozmieszczenie reszt cysteinowych, nie odpowiada strukturze białek klasy I, u roślin reszty cysteinowe zgrupowane w dwóch domenach terminalnych, domena centralna o długości ok. 40 aminokwasów zawiera aminokwasy aromatyczne [14], u roślin ze względu na aranżację reszt cysteinowych podzielono metalotioneiny na cztery typy [14]	u niektórych Prokaryota, u większości grzybów, u roślin, u zwierząt bezkręgowych
III	liniowe polimery dipeptydów $\gamma$ -glutamylcysteinowych, terminalnym aminokwasem najczęściej jest glicyna [14,66], syntezowane w drodze enzymatycznej [14,66]	kadystyny u niektórych grzybów [66], fitochelatyny u roślin [14]

Trzy dekady później Robinson i wsp. [60] odkryli, że większość jonów kadmu w komórkach bielunia indiańskiego związanych jest z peptydami indukowanymi przez metale, które później nazwano fitochelatynami (w tym samym roku zostały one zaliczone do metalotionein jako klasa III). Okazało się, że powstają one z glutationu w reakcji katalizowanej przez syntazę fitochelatynową i odpowiadają za detoksykację metali ciężkich [14, 60, 66]. Wraz z odkryciem białka Ec (*early cysteine-labeled*) zidentyfikowanego u pszenicy [36] zniknęły wątpliwości co do istnienia u roślin metalotionein typu zwierzęcego. Próby wyizolowania natywnych białek z innych gatunków roślin skończyły się niepowodzeniem, chociaż uzyskano zrekombinowane białka w komórkach *E. coli* [25, 65]. W toku dalszych badań okazało się, że strukturalnie podobne białka i kodujące je geny występują u niektórych cyjanobakterii i są szeroko rozpowszechnione w świecie grzybów, roślin i zwierząt [2, 7, 14, 47]. Zdecydowaną większość roślinnych genów kodujących metalotioneiny zidentyfikowano u roślin okrytonasiennych zarówno jedno-, jak i dwuliściennych. Niewiele jednak wiadomo na temat ich homologów u roślin nagonasiennych i glonów, chociaż podobne geny zidentyfikowano u daglezji [8],



TABELA 2. Klasyfikacja roślinnych metalotionein na podstawie aranżacji reszt cysteinowych wg [14]

Typ metalotioneiny	Liczba reszt cysteinowych i ich układ	Występowanie w roślinach
Typ 1	12 reszt w motywach Cys-X-Cys	kukurydza [18], groch [21], rzodkiewnik [14]
Typ 2	14 reszt w motywach Cys-Cys, Cys-X-Cys i Cys-X-X-Cys	pomidor [28], ryż [10], słonecznik bulwiasty [7]
Typ 3	10 reszt, część w motywach Cys-X-Cys	jabłoń [58], rzodkiewnik [50], winorośl [17], batat [9]
Typ 4	wyjątkowo trzy domeny bogate w reszty cysteinowe, których część jest zgrupowana w motywach Cys-X-Cys	pszenica [36], kukurydza [69], rzodkiewnik [29], petunia [30]

a także morskoczynu pęcherzykowatego [48]. Jednakże metalotioneiny przez nie kodowane mają odmienną strukturę, dlatego niezbędne są dalsze badania w celu ustalenia, czy również u tych gatunków obecna jest rodzina genów, podobna do tej, która występuje u roślin kwiatowych.

Niniejszy artykuł podsumowuje informacje dotyczące metalotionein roślinnych. Na temat fitochelatyn powstało wiele prac przeglądowych [13, 14, 56, 57, 60, 66, 72], dlatego zainteresowanego tym tematem czytelnika odsyłamy do nich.

## KLASYFIKACJA METALOTIONEIN

Pierwsze próby usystematyzowania przedstawicieli metalotionein pojawiły się w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy to wyodrębniono je jako osobną nadrodzinę białek [3]. Włączono do niej wszystkie te białka, które miały pewne cechy wspólne z pierwszą odkrytą metalotioneiną, wyizolowaną z nerki konia. Do tych cech należą: niska masa cząsteczkowa, wysoka zawartość reszt cysteinowych zgrupowanych w charakterystycznych motywach Cys-X-Cys (gdzie w miejscu X występuje dowolny aminokwas), a także obecność metali związanych z tymi białkami poprzez grupy tiolowe reszt cysteinowych. Jednakże obecność istotnych różnic pomiędzy białkami należącymi do nadrodziny przyczyniła się do jej podziału na trzy klasy, stworzonego na podstawie charakterystycznego wzorca rozmieszczenia reszt cysteinowych [14]. Poszczególne klasy scharakteryzowano w tabeli 1 i 2, a przykłady roślinnych genów metalotionein należących do klasy II i ich zależności filogenetyczne przedstawiono na rycinie 1a i b.

Alternatywną klasyfikację zaproponowali Binz i Kägi [3]. Podzielili oni nadrodzinę metalotionein na piętnaście rodzin, uwzględniając zarówno podobieństwa w strukturze pierwszorzędowej, jak i zależności filogenetyczne. Warto zwrócić uwagę, że według tej klasyfikacji do metalotionein nie należą fitochelatyny.

Typ 1

MSMT1 M-SGCSGCGKCGDNGSCSHYPD-----METNTTWTIEGVAPLKYSEGS-EKSF-GAEGNGCKGNSCKCDP-CNC-  
 IBMT1 M-SGCKGSDCKCGSDAC-----EEVTTTVTIEGVAPKLTLEGSEK---ATEGGHACKGNSCTCDP-CNC-  
 PSMT1 M-S-GCGSSNCGDCKNKRSSGLSYSEMHTTETVILGVPAKIOFEGA-EMSA-ASEDG-GCKGDNCTCDP-CNCK  
 ATW1a MADSNGCGSSCKGSDSC-----EKNY-NKECD-NCSGNSCSGNSNC-  
 ATMT1c MADSNGCGSSCKGSDSC-----EKNY-NKECD-NCSGNSCSGNSCHC-  
 ZMT1 -MS--CSCGSSCGSSCKGKYPDLEETSTAQPTVILGVAPEKKAAPERVEAAESEAHHGCSGSGCKCDP-CNC-  
 \* \* \* \* \*

Typ 2

ATW2a MS-CGGNGCGGSCCKGNGCGKYPDILGFSGETTTTETVLGVAPAMKNOYEAESGNSNAEND-----ACKGSDCKCDP-CTCK  
 ATW2b MS-CGSGCGGSAKCGNGCGCKRYPDI----ENTATETVLGVAPAMNSQYEASETFVAEND-----ACKGSDCKNP-CTCK  
 QW2 MS-CGGNGCGGTCKCGSGCGKMFDPIS--SEKTTTETLIVGVAQKT-HFEGS-EMGVAEN-----GCKGNSCTCDP-CNCK  
 MDW2 MSSCGGKCGGCVCSGSGNGCMAPDLISY-MEGSTTETLVGVAPOKS-HMEAS-EMGVAEN-----GCKGDNCTNP-CNCK  
 IBW2 MS-CGGNGCGGSAKCGGCGGKMFDPVE----NVKVTLLIQGVAPVNNITFEGA-EMGAGGD-GCKGSGSCGCPACNCDP-CNK-  
 HTW2 MS--CCNGKCGCGSSCSGSSCGNGCMYDPVEV---SATTVMIVDGVAPKQM-FAEGSEGSFVAEGGN-----CNCKGDNCKGNSC-  
 \* \* \* \* \*

Typ 3

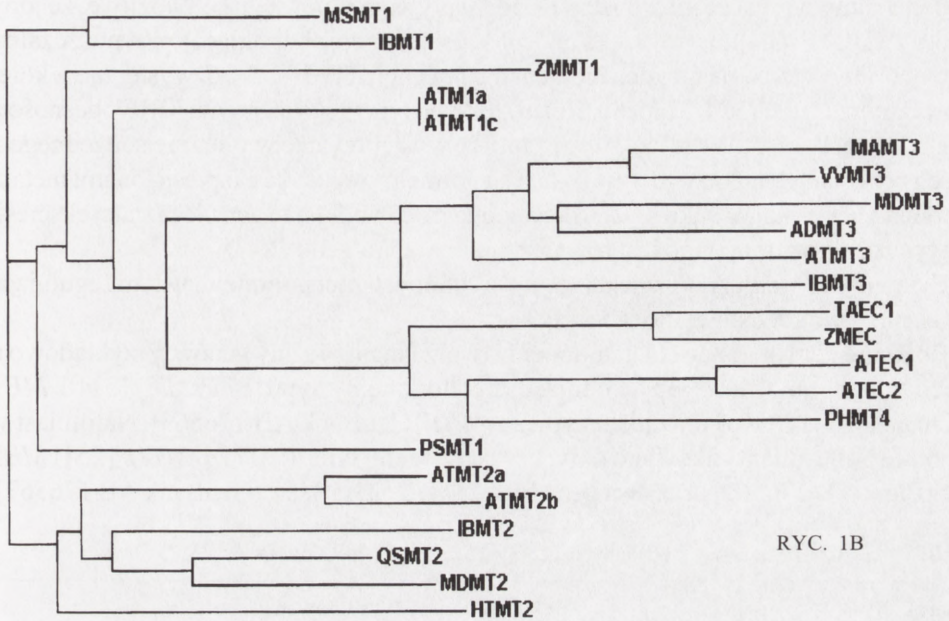
MAMT3 MST-CGNCDVKSQCVKKNGSYGIDIVETEKSYYDEVIVAAEAAEHDG--KCKGGAACACTDCKCGN-  
 VMT3 MST-CGNCDADKSCVKKNGSYGIDIVETEKSVAIVVNEVPAAQHEG--SKCGDSCACIDCTCG-  
 ADT3 MSXKGNCDADSQCVKKNGS--IDIETDKSYIEDVNGVPAEESG--KCKGTSCPVCNCTCD--  
 ATW3 MSSNGSCDCAKTQCVKKGTSTYFDIVETOESYKEAMINDVGAEENANCKKCGSSCSVNCCTCPN  
 MDW3 YSGKDNCDCA DSTQCVKKNGSYDVIIVETENRSMDFVFDAPAAEHDG--KCKGTGCSVSCCTCGH-  
 IBMT3 MSXKGNCDCA DSTQCTRKGRKMDVDVIFVTEKSYESIVKDI--AAENDG---CKCGANCSCTDRTCGH-  
 \* \* \* \* \*

Typ 4

ATEC1 MADTGKSSVAGNDSGCGPSPCGNSRCRMR-EASAG--DQGHMVCPEGHEHCGNFCNPKTQTQTSAGK-----CTCGEGCTASCAT-----  
 ATEC2 MADTGKSSASANDRCGCPSPCGEFCRCNMSEASGG--DOEHNTCPGEGHCGNFCNPKTQTQTSAGK-----CTCGEGCTACAA-----  
 PHMT4 MAD1-RGS-SAI CDRECGPSPFCFGVACRCSAGGAATAGGDMEHKKPCGEGHCGNFCITPKEGTTAGSGK-AHCKGPGCTCVQCAS-----  
 IAE1 -----GDDDKGCAVPCPGTGCRTSARPSGAAAG----EHTTTCGGEHCGNFCACGREGTPSGRANFRANCSGGAACNACSGSATA  
 ZMEC -----GDDDKGCAVPCPGKDCRCSG-SGGQR-----EHTTTCGGEHCGNFCITGRATMPSGRANFRANCSGASNCASCASA-----  
 \* \* \* \* \*

R.YC. 1A





RYC. 1B

RYCINA 1. A. Porównanie sekwencji aminokwasowych roślinnych metalotionein. Reszty cysteinowe konserwatywne w obrębie każdego typu oznaczono gwiazdkami. Sekwencje aminokwasowe ustalono na podstawie sekwencji nukleotydowych genów kroplika żółtego (MS), grochu (PS), rzodkiewnika (AT), batata (IB), dębu korkowego (QS), jabłoni domowej (MD), słonecznika bulwiastego (HT), bananowca (MA), winorośli (VV), aktinidii chińskiej (kiwi) (AD), pszenicy (TA), kukurydzy (ZM) i petunii (PH) [14, zmodyfikowane]. B – Dendrogram wykonany programem ClustalW, ukazujący zależności filogenetyczne między przedstawicielami czterech typów metalotionein

## STRUKTURA GENU I ORGANIZACJA GENOMOWA METALOTIONEIN

Dotychczas w genomowym DNA roślin zidentyfikowano sekwencje nielicznych genów kodujących metalotioneiny, jednak już te dane dostarczają pewnych informacji na temat ich struktury. Okazało się, że w przeciwieństwie do zwierzęcych, roślinne sekwencje promotorowe większości poznanych genów nie zawierają elementów odpowiedzi na metale, tzw. MRE (*metal response element*). U zwierząt to właśnie element MRE odpowiada za indukcję ekspresji genów metalotionein [60]. Odbyna się to przy udziale czynnika transkrypcyjnego MTF1 (*MRE-binding transcription factor*), który po połączeniu z jonami cynku transportowany jest z cytoplazmy do jądra komórkowego i tam aktywuje geny metalotionein w odpowiedzi na metale ciężkie, stres oksydacyjny i niedotlenienie [35].

W przypadku roślin jedynie w promotorze genu *LeMT<sub>B</sub>* występuje przypuszczalny element odpowiedzi na metale, jednak Whitelaw [70] nie wykazał, czy jest on funkcjonalny. Ten sam gen wyizolował Giritch [28] (nazwał go *LEMT1*) i wykazał aż

sześciokrotny wzrost ekspresji *LEM1* pod wpływem jonów cynku. Możliwe, że jony cynku działały indukująco dzięki obecności sekwencji obejmującej przypuszczalny element odpowiedzi na metale. Element o sekwencji TGCACACC występuje z kolei w promotorze genu *PsMT<sub>4</sub>* grochu. Różni się on od typowego elementu MRE obecnością adeniny w pozycji 6. Wcześniej wykazano, że występowanie w tym miejscu jednego z trzech pozostałych nukleotydów pozwala na normalną regulację ekspresji jonami metali. Natomiast sekwencja z nukleotydem adeninowym powoduje, że gen ulega stałej ekspresji na wysokim poziomie. Tak jest również w przypadku genu *PsMT<sub>4</sub>*.

Elementy charakterystyczne dla genów roślinnych metalotionein, w tym regulujące ich ekspresję, przedstawiono w tabeli 3.

Roślinne geny kodujące metalotioneiny tworzą małe rodziny genów. Przykładowo u grochu występują dwa geny kodujące metalotioneiny typu 1: *PsMT<sub>4</sub>* [21] i *MEY* [GenBank AB176564] oraz jeden typu 2 – *MET* [GenBank AB 176565]. Natomiast w genomie bobu zidentyfikowano dotychczas trzy geny typu 1: *MT1a*, *MT1b* [25] i *MET* [GenBank AB 176562] oraz dwa geny typu 2: *MT2* [25] i *MET* [GenBank AB 176563],

TABELA 3. Charakterystyka roślinnych genów kodujących metalotioneiny

Charakterystyczne elementy genu	Funkcja	Sekwencja	Występowanie
Elementy promotora			
MRE	Indukcja ekspresji pod wpływem jonów metali	TACGCGCG	gen <i>LeMTB</i> pomidora między -495 a -488 nt [70]
Element odpowiedzi na ABA	Indukcja lub represja ekspresji	CACGTGGA	gen <i>Ec</i> pszenicy między -608 a -601 nt [36] gen <i>B22EL8</i> jęczmienia [40]
Element wzmacniający działanie etylenu		AATCAAA	gen <i>LeMTB</i> pomidora między -418 a -411 nt [70]
Element G-box	Indukcja ekspresji pod wpływem stresu, światła, ABA, etylenu	CACGTG	gen <i>LeMTB</i> pomidora między -150 a -145 nt [70]
Introny			
Brak intronów			gen <i>Ec</i> pszenicy [36]
Jeden intron			geny typu 1: u kukurydzy [18], kostrzewy czerwonej [45], grochu [21]
Dwa introny			geny typu 2: u słonecznika bulwiastego [7], dębu korkowego [47], ryżu [14] oraz typu 3: u palmy olejowej [1]



a u topoli aż sześć genów, po dwa z typu 1, 2 i 3 [41]. U rzodkiewnika, ryżu i trzciny cukrowej występują geny kodujące wszystkie cztery typy metalotionein [14]. Niewykluczone, że również u innych gatunków istnieje taka sytuacja i w bliskiej przyszłości uda się wyizolować geny pozostałych typów.

Lokalizacja genów na chromosomach, określona dla rzodkiewnika w wyniku sekwencjonowania genomu [14, 74] oraz pomidora poprzez analizę RFLP [28], pozwoliła stwierdzić, że u tych roślin geny kodujące metalotioneiny są rozproszone w genomie. Podobnie jest u drożdży *Candida glabrata* i nicienia *Caenorhabditis elegans* [28], w przeciwieństwie do genomów ssaków, gdzie geny metalotionein znajdują się w bliskim sąsiedztwie [55].

## EKSPRESJA ROŚLINNYCH GENÓW KODUJĄCYCH METALOTIONEINY

Wiele genów kodujących metalotioneiny ulega w tkankach roślinnych silnej ekspresji. Potwierdza to analiza ekspresji genów ryżu wykorzystująca procedurę SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*). Okazało się, że najczęściej występującym transkryptem w liściach jest mRNA metalotioneiny typu 3. Stanowi on prawie 3% wszystkich transkryptów. Zidentyfikowano go także wśród puli mRNA w tkankach niedojrzałych

TABELA 4. Organospecyficzna ekspresja roślinnych genów kodujących metalotioneiny

Organy	Typy metalotionein	Gatunki roślin
Bulwy	typ 1 typ 2	batat [33] słonecznik bulwiasty [7]
Korzenie	typ 1 typ 2 i 3	kroplik żółty [19], groch [21], rzodkiewnik [26] pomidor [28], batat [9]
Łodygi	typ 1 typ 2 typ 3	batat [33] batat [9], słonecznik bulwiasty [7] batat [9]
Liście	typ 1 typ 2 typ 3	rzodkiewnik [26], batat [33] rzodkiewnik [73,50,26], pomidor [28], batat [9], słonecznik bulwiasty [7] jabłoń [58], batat [9]
Pąki	typ 2	słonecznik bulwiasty [7]
Kwiaty	typ 2	pomidor [28], kapusta pekińska [38]
Owoce	typ 1 typ 2 typ 3	gruszka japońska [34], jabłoń [58], gruszka japońska [34] kiwi [42], jabłoń [58], winorośl [17], palma olejowa [1]

nasion, jednakże w znacznie mniejszej ilości – spośród 100 najczęściej występujących tam transkryptów, uplasował się on na pozycji 42. Natomiast 28 pozycję na tej liście zajął transkrypt metalotioneiny typu 4 [27].

Geny kodujące metalotioneiny ulegają ekspresji pod wpływem różnych czynników zarówno endogennych, jak i egzogennych. U zwierząt wzrost stężenia metalotionein w komórce zależy od rozmaitych czynników chemicznych, tj. hormonów, cytokin, etanolu, kwasu masłowego, czynników alkilujących, endotoksyn, chloroformu, czterochlorku węgla, a także czynników stresowych, np. głodu, infekcji, szoku termicznego, naświetlania promieniami UV i Roentgena [2, 22, 24, 53, 71].

Przykłady czynników oraz mechanizmy ich oddziaływania na ekspresję metalotionein roślinnych przedstawiono w tabelach 4, 5 i 6. Najszerzej badano działanie jonów metali. W większości przypadków przyczyniały się one do wzrostu poziomu transkrypcji, chociaż u kroplika żółtego powodowały one represję ekspresji [19]. Obniżona ekspresja metalotionein przy dużej koncentracji jonów metali w środowisku może świadczyć, że takie białka są bardziej potrzebne w przypadku niskiego stężenia jonów metali. Wówczas działają one jako wydajne transportery tych jonów, dostarczające je do ważnych metaloprotein komórkowych [25]. U niektórych roślin synteza mRNA metalotionein

TABELA 5. Ekspresja roślinnych genów kodujących metalotioneiny pod wpływem jonów metali

Jony metali	Wpływ na ekspresję genów metalotionein	Typy metalotionein	Gatunki roślin
Miedź	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50], korzenie i pędy kostrzewy czerwonej [45] siewki rzodkiewnika [50]
	represja	typ 1 typ 2	korzenie kroplika żółtego [19] łodygi słonecznika bulwiastego [7]
Cynk	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50] siewki rzodkiewnika [50]
	represja	typ 2	łodygi słonecznika bulwiastego [7]
Kadm	indukcja	typ 1 typ 2 typ 3	liście rzodkiewnika [50], korzenie i pędy kostrzewy czerwonej [45] siewki rzodkiewnika [50] rzodkiewnik [43]
Nikiel	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50] siewki rzodkiewnika [50]
Srebro	indukcja	typ 1 typ 2	liście rzodkiewnika [50] siewki rzodkiewnika [50]



TABELA 6. Pozostałe czynniki wpływające na ekspresję roślinnych genów kodujących metalotioneiny

Czynnik	Typy metalotionein	Gatunki roślin
Kwas abscysynowy	typ 2 typ 4	ryż [32] zarodki pszenicy [36], zarodki kukurydzy [69]
Etylen	typ 1 typ 2	gruszka japońska [34] batat [9]
Wysoka temperatura	typ 1 typ 2	ryż [31,32] ryż [32], rzodkiewnik [49], dąb korkowy [47]
Niska temperatura	typ 2 i 3	jabłoń [58]
Stres oksydacyjny	typ 2	dąb korkowy [47]
Stres osmotyczny	typ 1 typ 4	rzodkiewnik [20] kukurydza [69]
Niska zawartość składników odżywczych w podłożu	typ 1 typ 2	pszenica [62,63], kukurydza [11], ryż [31,32] ryż [32]
Silne światło	typ 1	rzodkiewnik [20]
Susza	typ 1	rzodkiewnik [20,59]
Ciemność	typ 1 typ 2	rzepak [6] batat [9]
Zranienie	typ 1 typ 2	rzodkiewnik [59], rzepak [6] <i>Nicotiana glutinosa</i> [12]
Atak patogenów	typ 1 typ 2	rzodkiewnik [59] <i>Nicotiana glutinosa</i> [12]
Procesy fizjologiczne: kiełkowanie pyłku rozwój embrionalny dojrzewanie owoców starzenie się organów  nekroza apoptoza	typ 4 typ 4 typ 2 i 3 typ 1 typ 2 typ 3 typ 1 typ 1	petunia [30] pszenica [36], kukurydza [69] jabłoń [58] liście batata [33], rzodkiewnika [26], rzepaku [5] liście batata [9] liście winorośli [17], płatki kwiatów alstremerii [4] rzepak [6] czarny bez [15]

indukowana była obniżoną zawartością żelaza w podłożu. Tak było w przypadku transkryptu LEMT1 (*LeMT<sub>B</sub>*) u pomidora oraz jęczmienia. Jednakże w warunkach niedoboru żelaza rośliny akumulowały więcej miedzi, manganu i cynku i prawdopodobnie to było przyczyną podwyższonej ekspresji genów kodujących metalotioneiny [28].

## PRODUKTY BIAŁKOWE

Jak to zostało wspomniane we wstępie, metalotioneiny to białka o niskiej masie cząsteczkowej – poniżej 7000 Da, bogate w reszty cysteinowe, poprzez które wiążą jony metali. Są to monomery zbudowane z prostego łańcucha białkowego, u ssaków mającego długość około 60 aminokwasów [60]. Metalotioneiny zazwyczaj zawierają dwie domeny wiążące metale, które po połączeniu z ligandami nadają białku konformację hantelki [14] – jej rączka to krótki mostek aminokwasowy łączący dwie domeny (główki hantelki). Jakkolwiek wyizolowano wiele zwierzęcych metalotionein i dobrze poznano ich strukturę, to jednak u roślin sytuacja jest odmienna. Do tej pory udało się wyizolować i oczyścić w całości tylko jedno białko – Ec. W związku z tym przyjęło się nazywać geny roślinne „genami podobnymi do genów metalotionein” („*metallothionein-like genes*”) w obawie, że nie ulegają one translacji. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne biorąc pod uwagę fakt, że produkty transkrypcji wielu z nich obecne są w tkankach na wysokim poziomie i geny te kodują białka podobne do metalotionein zwierzęcych i grzybowych, z zawartym w ich sekwencji znanym motywem odpowiedzialnym za wiązanie metali [14]. Ponadto cząsteczki mRNA powstające na matrycy tych genów zawierają sygnał poliadenylacji (AAUAA) i ogon poli A; tak jest np. u pszenicy [36], kostrzewy czarwonej [45], kapusty pekińskiej [38], dębu korkowego [47] czy kroplika żółtego [19]. Transkrypty u tego ostatniego zawierają ponadto sekwencje miejsca wiązania do rybosomu, obecne są one również w transkryptach genu *LeMT<sub>4</sub>* pomidora [70].

Istnieją dowody wskazujące, że również pozostałe roślinne geny kodujące metalotioneiny ulegają translacji. Murphy i wsp. [50] wyizolowali z siewek rzodkiewnika trzy frakcje niskocząsteczkowych białek (o wielkości 4,5 kDa, 7 kDa i 8 kDa) bogatych w reszty cysteinowe i zdolnych do wiązania miedzi, co potwierdziła chromatografia powinowactwa. Białko o wielkości 8 kDa zdolne było również do wiązania cynku. Analiza sekwencji wykazała, że badaczom udało się wyizolować fragmenty metalotionein rzodkiewnika (ryc. 2). Frakcja o najniższej masie cząsteczkowej zawierała dwa peptydy składające się na jedną trzecią sekwencji aminokwasowej przewidzianej dla produktu genu *MT1a*. Frakcja o wielkości 8 kDa zawierała peptyd odpowiadający przypuszczalnej sekwencji MT2a i dwa fragmenty identyczne z częścią sekwencji przewidzianej dla MT2b. We frakcji o pośredniej wielkości otrzymano trzy peptydy, składające się na 45% przypuszczalnej sekwencji MT3. Murphy wykazał również, że wzory akumulacji białka MT1 i MT2 odpowiadają wcześniej ustalonemu wzorowi akumulacji mRNA, co potwierdziła analiza z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko MT1 i MT2. Ponadto przeciwciała skierowane przeciw MT2 reagowały z dwoma białkami o wielkości ok. 8 kDa, co jest zgodne z wynikami badań wskazującymi na istnienie dwóch izoform genu, *MT2a* i *MT2b*.



MT1a	MADSNCGCGS	SCKCGDSCSC	EKNYNKECDN	<u>CSCGSNCSCG</u>	SNCNC	
MT2a	MSCCGGNGCG	GSCKCKGNGC	GGCKMYPDLG	FSGETTTTET	FVLGVAPAMK	<u>NOYEASGESN</u>
	<u>NAENDACKCG</u>	<u>SDCKCDPCTC</u>	K			
MT2b	MSCCGGSCGC	GSACKCKGNGC	<u>GGCKRYPDLE</u>	NTATETLVLG	VAPAMNSQYE	ASGETFVAEN
	<u>DACKCGSDCK</u>	<u>CNPCTCK</u>				
MT3	MSSNCGSCDC	ADKTQCVKKG	TSYTFDIVET	QESYKEAMIM	DVGAEENNAN	CKCKCGSSCS
	CVNCTCCPN					

RYCINA 2. Sekwencje aminokwasowe metalotionein rzodkiewnika, ustalone na podstawie sekwencji nukleotydujących kodujących je genów. Podkreślono fragmenty, które zostały wyizolowane i zsekwencjonowane (wg [50] zmodyfikowane)

Kolejny dowód na istnienie metalotionein roślinnych dostarczył de Miranda z wsp. [19]. Podczas prób izolacji fitochelatyn z kroplika żółtego wyizolowano również niskocząsteczkowe białka wiążące miedź, niebędące  $\gamma$ -glutamylcysteinyloglicynami. Skład aminokwasowy i wielkość otrzymanych peptydów odpowiadała dwóm terminalnym domenom metalotioneiny. Wcześniejsza analiza komputerowa przypuszczalnej sekwencji aminokwasowej metalotioneiny kroplika przewidywała dla dwóch domen bogatych w reszty cysteinowe konformację zwiniętą, natomiast rozciągniętą dla domeny centralnej. Możliwe, że ta domena jest wycinana i w ten sposób powstają dwa mniejsze peptydy zdolne do wiązania metali [19]. Podobną sytuację zaobserwował Kille [37]. Wraz ze współpracownikami stransformował bakterie *E. coli* genem *PsMT<sub>A</sub>* grochu i hodował je w obecności kadmu, po czym wyizolował z nich frakcję wiążącą ten pierwiastek. Sekwencja aminokwasowa otrzymanych peptydów odpowiadała domenie N-terminalnej sekwencji aminokwasowej przewidzianej dla metalotioneiny grochu oraz fragmentom domeny centralnej, które mogły powstać przez jej proteolityczne cięcia. Ponadto frakcje bogate w kadm poddano działaniu proteiny K. Analiza produktów trawienia wykazała brak aminokwasów aromatycznych wchodzących w skład domeny centralnej, otrzymano natomiast peptydy odpowiadające sekwencjom aminokwasów 2-21 i 56-71 metalotioneiny grochu. Już wcześniej wykazano, że domeny skompleksowane z metalami chronione są przed proteolizą. Prawdopodobnie dlatego jedynie region domeny centralnej ulega trawieniu, nienaruszone pozostają natomiast domeny wiążące metale. Najwyraźniej mimo wycięcia domeny centralnej tworzą one zwarty kompleks złożony z dwóch peptydów połączonych ze sobą poprzez jony metali. Proteoliza metalotioneiny grochu w komórkach *E. coli* może odzwierciedlać sytuację panującą *in vivo* w tkankach roślinnych. Nasuwa się w związku z tym pytanie o rolę domeny centralnej. Wcześniejsze doświadczenia udowodniły, że wprowadzenie takiej domeny, złożonej z nie więcej niż 12 aminokwasów, do zrekombinowanej metalotioneiny ssaków nie zagraża jej stabilności. Jednak wydłużenie domeny do ponad 16 aminokwasów obniża zdolność metalotioneiny do detoksykacji metali. W metalotioneinie grochu jest ona jeszcze dłuższa i wrażliwa na atak proteolityczny. Możliwe, że domena centralna bierze udział w prawidłowym zwijaniu regionów wiążących metale [37]. Ponadto jej sekwencja jest konserwatywna, co może sugerować jej znaczenie funkcjonalne [73].

Podatność roślinnych metalotionein na atak proteolityczny może być przyczyną niepowodzeń w izolowaniu natywnych białek. Inną przyczyną niepowodzeń może być fakt, że metalotioneiny w obecności tlenu są wyjątkowo niestabilne [43, 47, 68]. Murphy

i wsp. [50] stwierdzili, że ekspozycja homogenatu tkankowego, z którego wyizolowano metalotioneiny rzodkiewnika, na tlen atmosferyczny prowadziła do degradacji lub utleniania metalotionein. Natomiast inne białka wiążące miedź nie ulegały rozpadowi w obecności tlenu.

Ze względu na trudności w prowadzeniu badań na metalotioneinach *in planta* podjęto zakończone sukcesami prace nad uzyskaniem zrekombinowanych metalotionein w komórkach drożdży i bakterii. Uzyskane białka przetestowano pod kątem zdolności do wiązania metali i uzyskiwania tolerancji wobec metali przez organizmy, w których ulegały ekspresji. Zrekombinowane białko *PsMT<sub>4</sub>* formowało kompleksy z miedzią, cynkiem i kadmem. Wartości pH, w których 50% metalu ulegało dysocjacji (kryterium stosowane dla odróżnienia metalotionein od innych białek wiążących metale), określone dla zrekombinowanej metalotioneiny grochu względem cynku i kadmu były zgodne z wartościami ustalonymi dla metalotioneiny konia [65]. Również trzy zrekombinowane metalotioneiny bobu były zdolne do wiązania wyżej wspomnianych jonów metali, gdy ulegały ekspresji w komórkach *E. coli* [25].

Ekspresja metalotionein rzodkiewnika w zmutowanych szczepach drożdży, pozbawionych endogennej metalotioneiny i przez to nadwrażliwych na metale ciężkie, komplementowała mutację przywracając tolerancję na miedź i kadm [73]. Podobnie ekspresja metalotioneiny kostrzewy czerwonej w mutantach drożdży umożliwiała im wzrost na pożywkach o dużych stężeniach miedzi, kadmu, chromu, cynku i ołowiu [45]. Ekspresja zrekombinowanej metalotioneiny typu 2 rzodkiewnika w zmutowanych komórkach *Synechococcus*, pozbawionych endogennej metalotioneiny cynkowej, częściowo komplementowała mutację. Natomiast zrekombinowana metalotioneina rzodkiewnika z komórek *E. coli* wykazywała wyższe powinowactwo wobec jonów cynku niż fitochelatyny [61].

Powyższe wyniki wskazują, że metalotioneiny roślinne, tak jak zwierzęce, zdolne są do spełniania biologicznej funkcji, czyli nadawania odporności na metale ciężkie.

## LOKALIZACJA KOMÓRKOWA

Zwierzęce metalotioneiny zostały zlokalizowane w cytoplazmie, a także w pewnych warunkach fizjologicznych w jądrze, w czasie przejścia z fazy  $G_1$  do S cyklu komórkowego [44] czy w okresie noworodkowym [22]. Co prawda metalotioneiny nie mają sygnału lokalizacji jądrowej, wykazano jednak, że są one związane z cytoszkieletem w przestrzeni perinuklearnej i dzięki temu możliwy jest ich szybki transport do jądra [44]. W przypadku roślinnych metalotionein lokalizację *MT2a* i *MT3* rzodkiewnika ulegających ekspresji w komórkach aparatów szparkowych bobu ustalono przy wykorzystaniu białek fuzyjnych z GFP. Zieloną fluorescencję zaobserwowano jedynie w cytoplazmie. Lokalizacja białek fuzyjnych nie ulegała zmianie w obecności kadmu, co sugeruje, że mechanizm detoksykacji metali jest odmienny niż u fitochelatyn, które po skompleksowaniu z metalami transportowane są do wakuoli [43].



## ROLA METALOTIONEIN U ROŚLIN

Reszty cysteinowe metalotionein są naturalnym ligandem dla cynku i miedzi. Chelatując te metale w warunkach fizjologicznych, metalotioneiny utrzymują ich homeostazę u zwierząt i grzybów [2, 52]. Białka te wiążą również metale toksyczne, głównie kadm, dzięki czemu chronią komórki przed ich szkodliwym wpływem [23, 24, 39], a także zapobiegają skutkom stresu oksydacyjnego. Wykazano, że metalotioneiny ssaków mogą funkcjonalnie komplementować dysmutazę ponadtlenkową u drożdży [16].

Rola roślinnych metalotionein nie jest dokładnie określona, choć na podstawie zebranych danych udało się zaproponować dla nich kilka przypuszczalnych funkcji. Sugeruje się udział tych białek w utrzymaniu homeostazy miedzi, która jest istotnym mikroelementem dla bakterii, grzybów, roślin i zwierząt. Wchodzi w skład grup prostetycznych wielu enzymów i pośredniczy w transporcie elektronów, jednak nadmiar jonów miedzi jest szkodliwy dla błon biologicznych, DNA i białek. Dostępność i transport miedzi podlegają ścisłej kontroli, dlatego w normalnych warunkach nie jest możliwe znalezienie wolnych jonów w komórce [64]. Zaangażowanie roślinnych metalotionein w gospodarkę miedzi potwierdzają liczne dowody. Zrekombinowane białka, uzyskane w komórkach *E. coli* transformowanych roślinnymi genami metalotionein, są zdolne do wiązania tych jonów [25, 47, 65]. Ponadto ekspresja genów roślinnych w zmutowanych szczepach drożdży, pozbawionych endogennej metalotioneiny, przywraca im tolerancję na obecność jonów miedzi [45, 73]. Miedź jest także najsilniejszym induktorem ekspresji genu *MT2* rzodkiewnika [43], z kolei ekspresja genu *MT1* tej rośliny zachodzi w organach bogatych w jony miedzi m.in. w pylnikach i słupkach. Wykazano, że niedobory miedzi zaburzają rozwój kwiatów, więc rola metalotionein może polegać na dostarczaniu do tych organów wspomnianych jonów [26]. Transkrypty obydwu wymienionych genów akumulują się także we włoskach liściowych, co odzwierciedla wymagania tych komórek na duże ilości miedzi, w związku z metabolizmem flawonoidów i antocyjanów oraz enzymów, takich jak peroksydaza i oksydaza polifenolowa, zaangażowanych w odpowiedź obronną [26]. Możliwe też, że metalotioneiny zaangażowane są w detoksykację metali w liściach. Chelatując metale w komórkach włosków, chronią komórki mezofilu przed ich szkodliwym wpływem [26].

Badania dotyczące lepnicy rozdętej wykazały, że osobniki, należące do populacji charakteryzującej się wysoką odpornością na miedź, miały wyższy poziom transkrypcji genu *SvMT2a* niż rośliny tego gatunku wrażliwe na jony miedzi. Analiza Southern-blot ujawniła, że jest to spowodowane amplifikacją genu *SvMT2a* w genomie osobników o podwyższonej tolerancji [67].

Należy również zwrócić uwagę na fakt, że fitochelatyny, roślinne peptydy odpowiedzialne za detoksykację kadmu [66] są co prawda zdolne do wiązania miedzi w warunkach *in vivo* [46], jednak mutanty rzodkiewnika pozbawione enzymu odpowiedzialnego za ich syntezę nie wykazują podwyższonej wrażliwości na ten pierwiastek. Tak więc fitochelatyny najwyraźniej nie uczestniczą w detoksykacji miedzi; w ten proces zaangażowany jest inny mechanizm, prawdopodobnie przy udziale metalotionein.

Sugeruje się również udział opisywanych białek w homeostazie cynku. Jedyna wyizolowana do tej pory roślinna metalotioneina skompleksowana była właśnie z jonami cynku [36]. Ponadto zauważono, że jej akumulacja zachodzi w określonym stadium rozwojowym zarodka, kiedy to następuje przejście od fazy proliferacji do różnicowania [36, 60]. Może to świadczyć o tym, że białko Ec jest magazynem cynku, dostępnego w razie potrzeby dla polimeraz DNA i RNA oraz czynników transkrypcyjnych [60]. U zwierząt wykazano udział metalotionein w procesie podziału komórki [71] oraz ich nagromadzenie w tkankach proliferujących i nowotworowych [22, 24]. Również u roślin zauważono akumulację mRNA metalotionein w tkankach intensywnie dzielących się [47], co wskazuje na udział w podziałach komórkowych także w organizmach roślinnych.

Roślinne metalotioneiny mogą być zaangażowane również w metabolizm innych metali niezbędnych dla organizmu oraz tolerancję na szkodliwe metale niepełniące roli fizjologicznej, czego dowodzą badania prowadzone zarówno na drożdżach, jak i roślinach [43, 45, 47, 73]. Ponadto sugeruje się udział tych białek w transporcie niektórych pierwiastków. Zauważono, że transkrypty gromadzą się w tkankach przewodzących liści oraz w starzejących się liściach, skąd przypuszczalnie wycofują pierwiastki potrzebne dla rozwoju pozostałych organów, właśnie za pośrednictwem systemu przewodzącego [26, 33].

Przypuszcza się również, że roślinne metalotioneiny chronią komórki przed stresem oksydacyjnym [9]. Jego bezpośrednią przyczyną jest podwyższony poziom reaktywnych form tlenu (ROS), do których zaliczamy rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i tlen singletowy. Modyfikują one różne związki biologiczne, jednak głównym składnikiem komórki ulegającym oksydacji są białka. Do powstawania ROS przyczyniają się zarówno źródła endogenne, np. reakcje peroksydacji lipidów czy reakcje katalizowane przez oksydazy i jony metali ( $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ ) oraz egzogenne, np. promieniowanie jonizujące. Organizmy bronią się przed ich szkodliwym wpływem wytwarzając związki o charakterze antyoksydantów. Ważną rolę spełniają również enzymy, takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza oraz białka wiążące jony miedzi i żelaza [54].

Transkrypty roślinnych metalotionein zlokalizowano w starzejących się liściach. Metalotioneiny mogą być tam potrzebne, by chronić sąsiednie tkanki przed wolnymi rodnikami powstającymi w procesach starzenia [33, 47, 54]. Ponadto czynniki generujące ROS odpowiedzialne są również za indukcję genów kodujących metalotioneiny [20], głównie są to metale ciężkie, które przyczyniają się do powstania stresu oksydacyjnego [55]. Silnego dowodu potwierdzającego zaangażowanie metalotionein w ochronę struktur komórkowych przed reaktywnymi formami tlenu dostarczyli Lee i wsp. [43], którzy udowodnili, że metalotioneina rzodkiewnika, ulegająca ekspresji w stransformowanych komórkach szparkowych bobu, powoduje obniżenie poziomu ROS, powstających po potraktowaniu komórek kadmem.



## UWAGI KOŃCOWE

Roślinne metalotioneiny, w przeciwieństwie do zwierzęcych, stanowią bardzo zróżnicowaną klasę białek; przejawia się to zarówno w ich strukturze, jak i regulacji ich ekspresji. U zwierząt występują cztery izoformy metalotionein oznaczone odpowiednio numerami I, II, III i IV. Wszystkie mają ten sam, konserwatywny wzorzec reszt cysteinowych i tylko dwie ostatnie izoformy są organospecyficzne [2, 51, 52]. U roślin sytuacja jest bardziej złożona. Różnorodna struktura pierwszorzędowa sprawia, że mimo podziału na cztery typy, niektórych białek nie można zakwalifikować do żadnego z nich. Ponadto nie udało się dotychczas ustalić uniwersalnego wzoru ekspresji; często nawet metalotioneiny należące do jednego typu, ale pochodzące z różnych gatunków, występują w innych organach. nierozstrzygnięta pozostaje również kwestia regulacji ekspresji roślinnych metalotionein. Jest to bez wątpienia proces wysoce skoordynowany i składa się na mechanizm homeostazy komórki. Przykładowo jony metali indukują w określonej tkance geny tylko jednego typu, a na inne albo nie mają wpływu, albo powodują ich represję. Nasuwa się w związku z tym wniosek, że różne typy metalotionein są funkcjonalnie odmienne.

Niezbędne są dalsze badania w tej dziedzinie, skupiające się zwłaszcza na wyizolowaniu natywnych produktów białkowych oraz poznaniu molekularnych mechanizmów regulacji kodujących je genów. Pozwoliłoby to w przyszłości wykorzystać je w fitoremediacji. Transformowanie roślin genami kodującymi metalotioneiny z gatunków odpornych na wysokie stężenia metali ciężkich przypuszczalnie podwyższyłoby ich tolerancję na ten czynnik, dzięki czemu mogłyby nie tylko żyć w zanieczyszczonym środowisku, ale i aktywnie je oczyszczać.

## LITERATURA

- [1] ABDULLAH SNA, CHEAH SC, MURPHY DJ. Isolation and characterisation of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 255–263.
- [2] BI Y, PALMITER RD, WOOD KM, MA Q. Induction of metallothionein I by phenolic antioxidants requires metal-activated transcription factor 1 (MTF-1) and zinc. *Biochem J* 2004; **380**: 695–703.
- [3] BINZ PA, KÄGI JHR. 1999; <http://www.biochem.unizh.ch/mtpage/classif.html>.
- [4] BREEZE E, WAGSTAFF C, HARRISON E, BRAMKE I, ROGERS H, STEAD A, THOMAS B, BUCHANAN-WOLLASTON V. Gene expression patterns to define stages of post-harvest senescence in *Alstroemeria* petals. *Plant Biotech J* 2004; **2**: 155–168.
- [5] BUCHANAN-WOLLASTON V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 1994; **105**: 839–846.
- [6] BUTT A, MOUSLEY C, MORRIS K, BEYNON J, CAN C, HOLUB E, GEENBERG JT, BUCHANAN-WOLLASTON V. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J* 1998; **16**: 209–221.
- [7] CHANG T, LIU X, XU H, MENG K, CHEN S, ZHU Z. A metallothionein-like gene *htMT2* strongly expressed in internodes and nodes of *Helianthus tuberosus* and effects of metal ion treatment on its expression. *Planta* 2004; **218**: 449–455.
- [8] CHATTAI M, KAUKINEN KH, TRANBARGER TJ, GUPTA PK, MISRA S. The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. *Plant Mol Biol* 1997; **34**: 243–254.

- [9] CHEN H-J, HOU W-C, YANG C-Y, HUANG D-J, LIU J-S, LIN Y-H. Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. *J Plant Physiol* 2003; **160**: 547–555.
- [10] CHEN WM, HSIEH HM, HUANG PC. Type 2 rice metallothionein-like gene has two introns. *DNA Seq* 1998; **8**: 223–228.
- [11] CHEVALIER C, BOURGEOIS E, PRADET A, RAYMOND P. Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 473–485.
- [12] CHOI D, KIM HM, YUN HK, PARK J-A, KIM WT, BOK SH. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 1996; **112**: 353–359.
- [13] COBBETT CS. Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 2000; **123**: 825–833.
- [14] COBBETT CS, GOLDSBROUGH P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 2002; **53**: 159–182.
- [15] COUPE SA, TAYLOR JE, ROBERTS JA. Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 1995; **197**: 442–447.
- [16] DALTON TP, LI Q, BITTEL D, LIANG L, ANDREWS GK. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26233–26241.
- [17] DAVIES C, ROBINSON SP. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* 2000; **122**: 803–812.
- [18] de FRAMOND A. A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*). Cloning and characterisation. *FEBS Lett* 1991; **290**: 103–106.
- [19] de MIRANDA JR, THOMAS MA, THURMAN DA, TOMSETT AB. Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *FEBS Lett* 1990; **260**: 277–280.
- [20] DUNAEVA M, ADAMSKA I. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 5521–5529.
- [21] EVANS M, GATEHOUSE LN, GATEHOUSE JA, ROBINSON NJ, CROY RRD. A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. *FEBS Lett* 1990; **262**: 29–32.
- [22] FLORIAŃCZYK B. Funkcja metalotionein w ustroju. *Post Hig Med Dośw* 1996; **50**: 375–382.
- [23] FLORIAŃCZYK B. Detoksykacyjna funkcja metalotionein. *Now Lek* 1997; **66**: 310–318.
- [24] FLORIAŃCZYK B. Czynniki indukujące syntezę metalotionein. *Post Hig Med Dośw* 2000; **54**: 687–697.
- [25] FOLEY RC, LIANG ZM, SINGH KB. Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 583–591.
- [26] GARCÍA-HERNÁNDEZ M, MURPHY A, TAIZ L. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1998; **118**: 387–397.
- [27] GIBBINGS JG, COOK BP, DFAULT MR, MADDEN SL, KHURI S, TURNBULL CJ, DUNWELL JM. Global transcript analysis of rice leaf and seed using SAGE technology. *Plant Biotech J* 2003; **1**: 271–285.
- [28] GIRITCH A, GANAL M, STEPHAN UW, BÄUMLEIN H. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Mol Biol* 1998; **37**: 701–714.
- [29] GUO WJ, BUNDITHYA W, GOLDSBROUGH PB. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* 2003; **159**: 369–381.
- [30] GUYON VN, ASTWOOD JD, GARNER EC, DUNKER AK, TAYLOR LP. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia. *Plant Physiol* 2000; **123**: 699–710.
- [31] HSIEH H-M, LIU WK, HUANG PC. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 381–389.
- [32] HSIEH H-M, LIU W-K, CHANG A, HUANG PC. RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 1996; **32**: 525–529.
- [33] HUANG YJ, TO KY, YAP M-N, CHIANG W-J, SUEN D-F, CHEN S-CG. Cloning and characterisation of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato. *Physiol Plant* 2001; **113**: 384–391.
- [34] ITAI A, TANABE K, TAMURA F, TANAKA T. Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. *J Exp Bot* 2000; **51**: 1163–1166.



- [35] JIANG H, FU K, ANDREWS K. Gene- and cell-type-specific effects of signal transduction cascades on metal-regulated gene transcription appear to be independent of changes in the phosphorylation of metal-response-element-binding transcription factor-1. *Biochem J* 2004; **382**: 33–41.
- [36] KAWASHIMA I, KENNEDY TD, CHINO M, LANE BG. Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes, wheat Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 971–976.
- [37] KILLE P, WINGE DR, HARWOOD JL, KAY J. A plant metallothionein produced in *E. coli*. *FEBS Lett* 1991; **295**: 171–175.
- [38] KIM HU, KIM JB, YUN CH, KANG SK, CHUNG TY. Nucleotide sequence of cDNA clone encoding a metallothionein-like protein from Chinese cabbage. *Plant Physiol* 1995; **108**: 863.
- [39] KLAASSEN CD, LIU J, CHOUDHURI S. Metallothionein: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; **39**: 267–294.
- [40] KLEMSDAL SS, HUGHES W, LONNEBORG A, AALEN RB, OLSEN OA. Primary structure of a novel barley gene differentially expressed in immature aleurone layers. *Mol Gen Genet* 1991; **228**: 9–16.
- [41] KOHLER A, BLAUDEZ D, CHALOT M, MARTIN F. Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist* 2004; **164**: 83–93.
- [42] LEDGER SE, GARDNER RC. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 877–886.
- [43] LEE J, SHIM D, SONG W-Y, HWANG I, LEE Y. *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol Biol* 2004; **54**: 805–815.
- [44] LEVADOUX M, MAHON C, BEATTIE JH, WALLACE HM, HESKETH JE. Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. *J Biol Chem* 1999; **49**: 34961–34966.
- [45] MA M, LAU P-S, JIA Y-T, TSANG W-K, LAM SKS, TAM N FY, WONG Y-S. The isolation and characterization of type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Sci* 2003; **164**: 51–60.
- [46] MAITANI T, KUBOTA H, SATO K, YAMADA T. The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* 1996; **110**: 1145–1150.
- [47] MIR G, DOMÈNECH J, HUGUET G, GUO W-J, GOLDSBROUGH P, ATRIAN S, MOLINAS M. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *J Exp Bot* 2004; **55**: 2483–2493.
- [48] MORRIS CA, NICOLAUS B, SAMPSON V, HARWOOD JL, KILLE P. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from marine alga *Fucus vesiculosus*. *Biochem J* 1999; **338**: 553–560.
- [49] MURPHY A, TAIZ L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol* 1995; **109**: 945–954.
- [50] MURPHY A, ZHOU J, GOLDSBROUGH PB, TAIZ L. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1997; **113**: 1293–1301.
- [51] OPPERMANN B, ZHANG W, MAGABO K, KANTOROW M. Identification and spatial analysis of metallothioneins expressed by the adult human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; **42**: 188–193.
- [52] PALMITER RD. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8428–8430.
- [53] PECZYŃSKA-CZOCZ W. Metalotioneiny. *Wiad Chem* 1995; **49**: 515–524.
- [54] PONCZEK MB, WACHOWICZ B. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Post Bioch* 2005; **51**: 140–145.
- [55] PUZIO M. Metalotioneiny jako regulatory poziomu metali ciężkich; rola w komórkach układu odpornościowego. *Wszechświat* 2004; **105**: 161–164.
- [56] RAUSER WE. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1141–1149.
- [57] RAUSER WE. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, aminoacids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 1999; **31**: 19–48.
- [58] REID S, ROSS GS. Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. *Physiol Plant* 1997; **100**: 183–189.
- [59] REYMOND P, WEBER H, DAMOND M, FARMER EE. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000; **12**: 707–719.
- [60] ROBINSON NJ, TOMMEY AM, KUSKE C, JACKSON JP. Plant metallothioneins. *Biochem J* 1993; **295**: 1–10.

- [61] ROBINSON NJ, WILSON JR, TURNER JS. Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn<sup>(2+)</sup>-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in Zn<sup>2+</sup> metabolism. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 1169–1179.
- [62] SNOWDEN KC, GARDNER RC. Five genes induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol* 1993; **103**: 855–861.
- [63] SNOWDEN KC, RICHARDS KD, GARDNER RC. Aluminium induced genes. Induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol* 1995; **107**: 341–348.
- [64] TAPIA L, GONZÁLEZ-AGÜERO M, CISTERNAS MF, SUAZO M, CAMBIAZO V, UAUY R, GONZÁLEZ M. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem J* 2004; **378**: 617–624.
- [65] TOMMEY AM, SHI J, WILLIAM PL, URWIN PE, ROBINSON NJ. Expression of the pea gene *PsMT<sub>1</sub>* in *E. coli*. Metal binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett* 1991; **292**: 48–52.
- [66] TUKENDORF A. Fitochelaty. *Post Bioch* 1993; **39**: 60–67.
- [67] van HOOFF NA, HASSINEN VH, HAKVOORT HW, BALLINTIJJN KF, SCHAT H, VERKLEIJ JA, ERNST WH, KARENLAMPI SO, TERVAHAUTA AI. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1519–1526.
- [68] WASINKIEWICZ K, WOJTERA J, TOMASZEWSKA B. Transformowanie roślin w celu ich wykorzystania w fitoremediacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi. *Biotechnologia* 2004; **64**: 108–126.
- [69] WHITE CN, RIVIN CJ. Characterization and expression of a cDNA encoding a seed-specific metallothionein in maize. *Plant Physiol* 1995; **108**: 831–832.
- [70] WHITELAW CA, LE HUQUET JA, THURMAN DA, TOMSETT AB. The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 503–511.
- [71] WŁOSTOWSKI T. Metalotioneina a podział komórki. *Kosmos* 1995; **44**: 89–98.
- [72] ZENK MH. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 1996; **179**: 21–30.
- [73] ZHOU J, GOLDSBROUGH PB. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1994; **6**: 875–884.
- [74] ZHOU J, GOLDSBROUGH PB. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 318–328.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano; 06.02.2006 r.

Przyjęto; 18.04.2006 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,

e-mail: browsk@uni.torun.pl



## INTERLEUKINA 15: CHARAKTERYSTYKA I AKTYWNOŚĆ W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH

### INTERLEUKIN 15: GENERAL CHARACTERISTICS AND ACTIVITY IN PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Grzegorz Władysław BASAK<sup>1,2</sup>, Witold LASEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury oraz <sup>2</sup>Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Warszawie

*Streszczenie:* Interleukina 15 (IL-15) jest cytokiną o wielokierunkowym wpływie na układ odpornościowy. Początkowo uważana była za cytokinę o działaniu zbliżonym do IL-2, jednak z czasem zgromadzone dowody świadczące o jej odmienności działania. IL-15 wpływa zarówno na mechanizmy odporności swoistej, jak i nieswoistej. Indukuje ona powstawanie oraz różnicowanie komórek NK, a także jest dla nich czynnikiem chemotaktycznym. Prowadzi do nasilenia aktywności cytotoksycznej komórek NK, jak też intensywnego wydzielania IFN- $\gamma$  przez te komórki. IL-15 wpływa również na aktywność makrofagów oraz granulocytów obojętnochłonnych. Równie istotny jest wpływ IL-15 na limfocyty T. W przeciwieństwie do IL-2, która indukuje śmierć pobudzonych limfocytów T, IL-15 działa antyapoptotycznie na te komórki, prowadząc do ich proliferacji. Stanowi czynnik wzrostu dla limfocytów T CD8<sup>+</sup> pamięci, a w określonych warunkach wyzwała ich aktywację niezależną od antygeny i właściwości cytotoksyczne. Jest także czynnikiem chemotaktycznym dla limfocytów T. Wpływa również na aktywację komórek dendrytycznych. Według najnowszych poglądów, aktywną fizjologicznie formą IL-15 wydaje się być IL-15 w kompleksie z jej receptorem IL-15R $\alpha$  o wysokim powinowactwie. W ten sposób, cytokina ta może być „ujawniana” komórkom efektorowym. W pracy przedstawiono przegląd aktualnych badań dotyczących podstawowych właściwości IL-15, jej receptorów oraz oddziaływania na poszczególne populacje komórek układu odpornościowego.

*Słowa kluczowe:* interleukina 15, immunomodulacja, limfocyty T pamięci.

*Summary:* Interleukin 15 (IL-15) is a cytokine that reveals multiple actions on immune system. Initially it was thought to resemble IL-2, but there is still growing evidence that IL-15 has multiple, unique properties, in some cases acting opposingly to IL-2. IL-15 influences mechanisms of both innate and acquired immunity. It induces differentiation and proliferation of NK cells, increases their cytotoxic properties and ability of IFN- $\gamma$  secretion and also serves as chemoattractant for them. IL-15 acts also on macrophages/monocytes as well as on neutrophils. In contrary to IL-2, which induces activation-induced cell death (AICD) of T lymphocytes, IL-15 potently inhibits this process and induces their proliferation. It serves as growth factor for CD8<sup>+</sup> memory T lymphocytes. In certain conditions IL-15 causes their

antigen-independent activation and enhances cytotoxic properties. IL-15 seems to be essential in early activation of dendritic cells. Surprisingly, in many of its actions, the physiologically active form of IL-15 is thought to be bound to its high-affinity receptor IL-15R $\alpha$  and presented *in trans* to effector cells. The current article summarizes actual opinions and findings on basic properties of IL-15, its receptor complex and also its impact on immune system.

**Keywords:** interleukin 15, immunomodulation, memory T lymphocytes.

**Wykaz skrótów:** **ADCC** (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał; **AICD** (*activation induced cell death*) – śmierć komórki indukowana jej aktywacją; **APC** (*antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen; **CTL** (*cytotoxic T lymphocytes*) – limfocyty T cytotoksyczne; **DC** (*dendritic cells*) – komórki dendrytyczne; **IEL** (*intraepithelial lymphocytes*) – limfocyty śród nabłonkowe; **IFN- $\gamma$**  – interferon  $\gamma$ ; **IL** – interleukina; **IL-15/IL-15R $\alpha$**  – kompleks IL-15 i receptora o wysokim powinowactwie IL-15R $\alpha$ ; **LSP-IL-15** (*long signal peptide IL-15*) – forma IL-15 o długim peptydzie sygnałowym; **MCP-1** (*monocyte chemotactic protein*) – białko chemotaktyczne dla monocytów; **Myszy IL-15tg** – myszy modyfikowane genetycznie o podwyższonej konstytucyjnej ekspresji IL-15; **Myszy IL-15<sup>-/-</sup>** – myszy modyfikowane genetycznie niewykazujące ekspresji IL-15; **Myszy IL-15R $\alpha$ <sup>-/-</sup>** – myszy modyfikowane genetycznie niewykazujące ekspresji IL-15R $\alpha$ ; **NO** – tlenek azotu; **NK pre** (*NK cell precursors*) – komórki prekursorowe komórek NK; **NK pro** (*NK cell progenitors*) – komórki progenitorowe komórek NK; **NKT** (*natural killer T cell*) – komórka NKT; **SSP-IL-15** (*short signal peptide IL-15*) – forma IL-15 o krótkim peptydzie sygnałowym; **TCR** (*T cell receptor*) – receptor limfocytów T; **Th** (*T helper*) – limfocyty pomocnicze; **TNF- $\alpha$**  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) – czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$ ; **UTR** – rejon niepodlegający translacji.

## OGÓLNE WŁAŚCIWOŚCI IL-15

IL-15 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 14-15 kDa, zbudowaną ze 114 aminokwasów [54], zawierającą 2 mostki dwusiarczkowe w pozycjach C42-C88 oraz C35-C85 oraz dwa miejsca glikozylacji N79 oraz N112 na końcu C [110]. Należy ona do rodziny cytokin mających w strukturze cztery helisy  $\alpha$  połączone pętlami, obejmującej także IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 i IL-9 [12, 54]. IL-15 jest białkiem konserwatywnym ewolucyjnie – pomiędzy IL-15 człowieka i myszy jest 73% podobieństwa [54].

Pomimo powszechnego występowania w wielu tkankach mRNA kodującego IL-15, zdolność do syntezy białka wykazują tylko niektóre komórki, a inne nabywają ją dopiero po aktywacji. W rozpoczynającej się odpowiedzi immunologicznej, ważnym źródłem IL-15 są makrofagi i monocyty, a następnie również komórki dendrytyczne. Produkowana jest także przez komórki podścieliska szpiku, komórki nabłonkowe grasicy oraz nabłonek płodowego jelita, co ma przypuszczalnie związek z aktywnością IL-15 podczas hematopoezy, jak też przez komórki nabłonkowe oraz fibroblasty [40].

Gen kodujący IL-15 znajduje się u człowieka na chromosomie 4q31, natomiast u myszy w centralnej części chromosomu 8 [5]. Składa się z 9 egzonów (egzony 1–8 oraz egzon 4a, odkryty jako ostatni, kodujący alternatywny peptyd liderowy) [90]. W cząsteczce mRNA wyróżniamy rejon niepodlegający translacji (UTR) 5' o długości 316 par zasad (pz), ramkę odczytu o długości 486 pz oraz UTR 3' o długości co najmniej 400 pz. Koduje ona prekursor IL-15 o dłuższym niż u większości innych białek peptydzie liderowym (składającym się z 48 aminokwasów). Klasyczny, długi peptyd liderowy (LSP-IL-15) jest kodowany przez egzon 3, 4 i 5 genu dla ludzkiej IL-15 [5]. IL-15 istnieje także



pod postacią białka o krótkim peptydzie liderowym (SSP-IL-15). 21-aminokwasowy peptyd sygnałowy jest kodowany wtedy przez egzon 5 oraz dodatkowy egzon 4a [90]. Jednak forma SSP-IL-15 nie jest wydzielana, lecz jest raczej przechowywana wewnątrzkomórkowo w jądrze i cytoplazmie. Natomiast forma LSP-IL-15 jest wykrywana w siateczce śródplazmatycznej i następnie wydzielana [90, 125].

Pomimo powszechnego występowania transkryptu, IL-15 podlega bardzo mało wydajnej translacji i sekrecji. Produkcja IL-15 jest bowiem ściśle regulowana. Umiarkowana kontrola ekspresji ma miejsce na poziomie transkrypcji, natomiast jej główna część odbywa się na etapie translacji oraz transportu wewnątrzkomórkowego. W regulacji poziomu transkrypcji biorą udział sekwencje regulatorowe IRF-E oraz NF- $\kappa$ B wiążące się odpowiednio z czynnikami IRF-1/2 oraz NF- $\kappa$ B [132]. Regulacja ekspresji poszczególnych rodzajów mRNA kodujących SSP-IL-15 lub LSP-IL-15 może odbywać się przez alternatywny *splicing* lub/i przez działanie dodatkowego, nieznanego promotora odpowiedzialnego za powstawanie krótszej formy mRNA [125]. Uważa się, że za kontrolę wytwarzania IL-15 na etapie posttranskrypcyjnym odpowiedzialne są trzy główne mechanizmy regulatorowe: liczne kodony startu (AUG) w rejonie niepodlegającym translacji 5' (5'-UTR), dwa różne peptydy sygnałowe oraz negatywny fragment regulatorowy w pobliżu końca C białka prekursorowego. Ominięcie za pomocą inżynierii genetycznej tych trzech etapów pozwoliło na 250-krotne zwiększenie poziomu wydzielania IL-15 [10]. Zasugerowano jednocześnie, że poprzez przechowywanie nieaktywnego translacyjnie mRNA dla IL-15, komórki mogłyby odpowiadać na infekcje wewnątrzkomórkowe i inne bodźce za pomocą gwałtownego przekształcania mRNA w formę aktywnie podlegającą translacji. Zasugerowano, że regulacyjny wpływ na poziom IL-15 może mieć także jej gwałtowne pochłanianie przez komórki wykazujące ekspresję receptora dla IL-15 o wysokim powinowactwie [47].

Dotychczas zidentyfikowano dwa typy receptorów dla IL-15. Najlepiej poznano budowę i funkcje receptora typu I, zbudowanego z trzech podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  ( $\gamma_c$ ) (ryc. 1). Dwie ostatnie wchodzi także w skład receptora dla IL-2: IL-2/15R $\beta$  oraz IL-2/15R $\gamma$  ( $\gamma_c$ ) [51], co warunkuje pewne cechy wspólne tych cytokin. Zarówno IL-2, jak i IL-15 mają jednak odrębne łańcuchy  $\alpha$ : IL-2R $\alpha$  dla IL-2 oraz IL-15R $\alpha$  dla IL-15 [52]. IL-2/15R $\beta$  oraz  $\gamma_c$  występują konstytutywnie na powierzchni komórek NK, a także monocytów i limfocytów T [63]. Pomimo że do optymalnego przekazywania sygnału wymagany jest kompleks receptorowy złożony z trzech podjednostek, receptor IL-2/15R $\beta\gamma_c$  może przewodzić sygnał także samodzielnie, wiążąc IL-15 z pośrednim powinowactwem [6].

IL-15R $\alpha$  występuje na aktywowanych, ale nie spoczynkowych makrofagach, komórkach NK, limfocytach CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> [27]. Jednak transkrypt dla IL-15R $\alpha$  wykryto także m.in. w sercu, wątrobie, śledzionie, płucach, mięśniach szkieletowych oraz na aktywowanych komórkach śródbłonna [52]. IL-15R $\alpha$  charakteryzuje wiązanie IL-15 z wysokim powinowactwem [6]. Choć początkowo sądzono, że IL-15R $\alpha$  nie ma zdolności do samodzielnego przekazywania sygnału, ostatnie doniesienia sugerują, że może on wpływać na właściwości antyapoptotyczne IL-15 [18], jak również regulować poziom ekspresji czynnika jądrowego aktywowanych limfocytów T (NF-AT) [37].

Ze względu na to, że IL-15 oraz IL-2 mogą wiązać się ze wspólnym receptorem IL-2/15R $\beta\gamma$ , wydaje się, że w pewnym zakresie ich szlak przekazywania sygnału może wyglądać podobnie, jeśli nie identycznie. W aktywowanych limfocytach T, przyłączenie IL-15 do IL-15R $\beta$  aktywuje kinazę Janusową 1 (JAK1) oraz białka STAT3, natomiast w przypadku podjednostki  $\gamma_c$  następuje aktywacja JAK3 oraz STAT5 [61]. Szlaki przekazywania sygnałów przez IL-2 i IL-15 w limfocytach T obejmują także fosforylację cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych p56<sup>lck</sup> oraz p72<sup>syk</sup>, indukcję ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2 oraz stymulację szlaku kinaz MAP, prowadzącą do aktywacji czynników Fos/Jun [92]. Wykazano, że stymulacja za pomocą IL-15 prowadzi w leukocytach krwi obwodowej do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B oraz AP-1, natomiast w neutrofilach jedynie NF- $\kappa$ B [89].

W obliczu opisanych powyżej podobieństw w szlaku przekazywania sygnału przez IL-2 oraz IL-15 wydaje się, że różnice działania tych cytokin mogą zależeć od odmiennej dystrybucji ich receptorów  $\alpha$

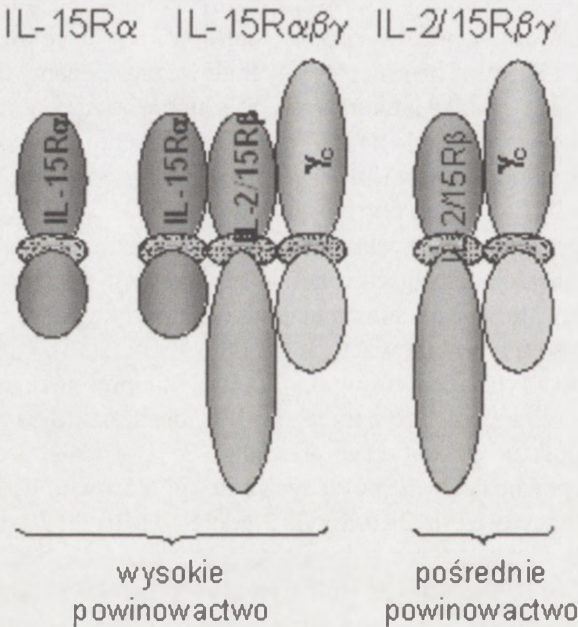
[42]. Jednak doniesienia o odrębnym przekazywaniu sygnałów przez IL-15R $\alpha$ , być może każą zweryfikować ten pogląd.

Odkryto także receptor dla IL-15 typu II, o masie 60–65 kDa, który nazwano IL-15RX. Występuje on na komórkach tłuszcznych, nie zawiera żadnego z elementów powyżej opisanego receptora i odpowiedzialny jest za przewodzenie innego rodzaju sygnału wewnątrzkomórkowego [124].

Czynnikiem istotnie wpływającym na aktywność IL-15 w organizmie jest jej występowanie w formie związanej z błoną komórkową. Wykazano, że wolna IL-15 jest wydzielana nawet przez monocyty jedynie w warunkach przewlekłej stymulacji. Zwykle gromadzą one IL-15 wewnątrzkomórkowo, natomiast po aktywacji gwałtownie przemieszczają ją do

RYCINA 1. Heterotrimeryczny receptor dla IL-15 o wysokim powinowactwie składa się z trzech podjednostek IL-15R $\alpha$ , IL-2/15R $\beta$  i  $\gamma_c$ . Receptor dla IL-15 może występować także w formie monomerycznej jako IL-15R $\alpha$ , wiążący IL-15 z wysokim powinowactwem oraz IL-2/15R $\beta\gamma$  o pośrednim powinowactwie do IL-15 (wiązący jednak z wysokim powinowactwem IL-15 ujawnianą na powierzchni IL-15R $\alpha$  – wyjaśnienie zjawiska w dalszej części tekstu)

błony komórkowej [98]. Według ostatnich doniesień, występująca na powierzchni komórek IL-15 jest związana z receptorem o wysokim powinowactwie – IL-15R $\alpha$ . Komórki mające IL-15R $\alpha$  mogą dzięki temu wychwytywać IL-15 występującą nawet





w niskich, fizjologicznych stężeniach i dostarczać ją innym komórkom. Szczególnie istotny jest fakt, że kompleks IL-15/IL-15R $\alpha$ , w przeciwieństwie do wolnej IL-15, aktywuje równie silnie komórki mające heterotrimeryczny receptor IL-15R $\alpha$ /IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , jak też sam IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  [34]. Przepuszczalnie, zmiana konformacji IL-15 po związaniu z IL-15R $\alpha$  wpływa na wzrost powinowactwa do IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ . Dlatego eliminuje to potrzebę ekspresji IL-15R $\alpha$  na efektorowych limfocytach T i komórkach NK *in vivo*. Zaproponowano, że IL-15/IL-15R $\alpha$  może być formą aktywną IL-15, co tłumaczyłoby fakt, że IL-15, w warunkach fizjologicznych, praktycznie nie można wykryć w płynach organizmu [70]. Ponadto, produkcja IL-15 oraz IL-15R $\alpha$  może odbywać się w tych samych komórkach, umożliwiając tworzenie kompleksów na powierzchni monocytów, komórek dendrytycznych i komórek podścieliska [34]. Wysłano hipotezę mówiącą, że komórki mające IL-15R $\alpha$  mogą stanowić także rezerwuuar IL-15 znajdującej się albo w kompleksie z receptorem, albo, po endocytozie, przechowywanej wewnątrzkomórkowo [70].

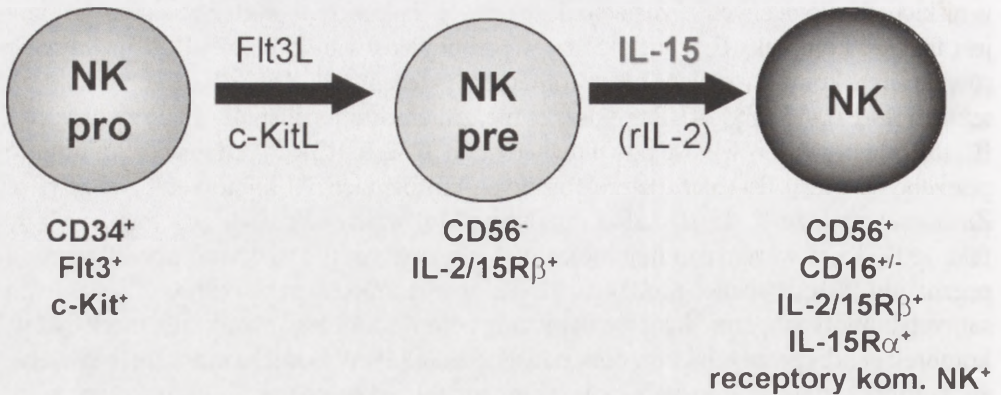
W świetle najnowszych doniesień, powierzchniowa IL-15 może działać nie tylko jako ligand, ale także jako receptor [99]. Po związaniu nieznanego ligandu (przypuszczalnie IL-2/IL-15R), przekazuje sygnał wewnątrzkomórkowy aktywując małe GTP-azy oraz kinazy MAP, co prowadzi do zjawisk związanych z adhezją komórek oraz produkcją cytokin.

Pragnąc zbadać wpływ IL-15 na różnorodne populacje komórkowe oraz ich wzajemne zależności, skonstruowano myszy pozbawione IL-15 (IL-15 $^{-/-}$ ) [68] lub IL-15R $\alpha$  (IL-15R $\alpha$  $^{-/-}$ ) [81]. Badania wykazały, że zwierzęta te cechują się podobnymi defektami w zakresie komórek NK, NKT, limfocytów śród nabłonkowych (IEL) oraz limfocytów T CD8 $^{+}$ . Myszy te mają wybitnie obniżoną liczbę komórek NK, a ich splenocyty nie wykazują aktywności cytotoksycznej. Charakteryzują się także znacznie obniżoną liczbą komórek NKT oraz IEL, wśród których najbardziej zredukowana została liczba limfocytów T $\gamma\delta$ . Także liczebność populacji limfocytów CD8 $^{+}$ , zwłaszcza o fenotypie komórek pamięci, jest znacznie obniżona. Jednak fenotypy myszy IL-15 $^{-/-}$  oraz IL-15R $\alpha$  $^{-/-}$  nie są identyczne. U myszy IL-15 $^{-/-}$  rozwój limfocytów CD4 $^{+}$  i CD8 $^{+}$  w grasicy zachodzi prawidłowo. W przeciwieństwie do nich, myszy IL-15R $\alpha$  $^{-/-}$  charakteryzują się upośledzonym rozwojem limfocytów CD8 $^{+}$ , jak też znaczną limfopenią.

Z drugiej strony, myszy transgeniczne z upośledzoną potranskrypcyjną kontrolą ekspresji IL-15, które wydajnie syntetyzują oraz wydzielają IL-15, cechują się znaczną limfocytosą krwi obwodowej ze wzrostem odsetka komórek NK oraz limfocytów pamięci CD8 $^{+}$ , a po kilku miesiącach rozwijają białaczkę limfoblastyczną typu NK lub NKT [45].

## KOMÓRKI NK

IL-15 jest czynnikiem niezbędnym dla zachodzącego w szpiku kostnym rozwoju funkcjonalnych komórek NK. Komórki progenitorowe komórek NK (NKpro) w wyniku działania czynników c-KitL oraz Flt3L, różnicują się w wykazujące ekspresję IL-2/



RYCINA 2. Schemat rozwoju komórek NK (adaptowane z [42]). Uważa się, że IL-15 jest fizjologicznym czynnikiem różnicowania komórek NKpre w dojrzałe komórki NK. Tę samą rolę, w warunkach eksperymentalnych lub po ingerencji terapeutycznej, może spełniać IL-2, jednak w warunkach fizjologicznych występuje w szpiku jedynie w niewielkich ilościach

15Rβ komórki prekursorowe (NKpre). Te z kolei odpowiadają na IL-15 różnicując się do dojrzałych komórek NK [42] (ryc. 2). W warunkach eksperymentalnych *in vitro* wykazano również zdolność do różnicowania komórek NK pod wpływem IL-15 z komórek CD34<sup>+</sup> z krwi pępowinowej [21, 26], komórek CD34<sup>+</sup> ze szpiku [21], pochodzących z płodowej wątroby komórek CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [59] oraz komórek progenitorowych pochodzących z grasicy [91].

Komórki NK powstające *in vitro* pod wpływem IL-15 z komórek hematopoetycznych przypominają subpopulację komórek NK CD56<sup>bright</sup>, które w warunkach fizjologicznych stanowią niewielki procent ogólnej populacji komórek NK. Nie mają one na swojej powierzchni receptorów KIR ani Ly-49 [140]. Wprawdzie wykazują one właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych, ale ich charakterystyczną właściwością jest intensywne wydzielanie cytokin i chemokin po uprzedniej stymulacji [42].

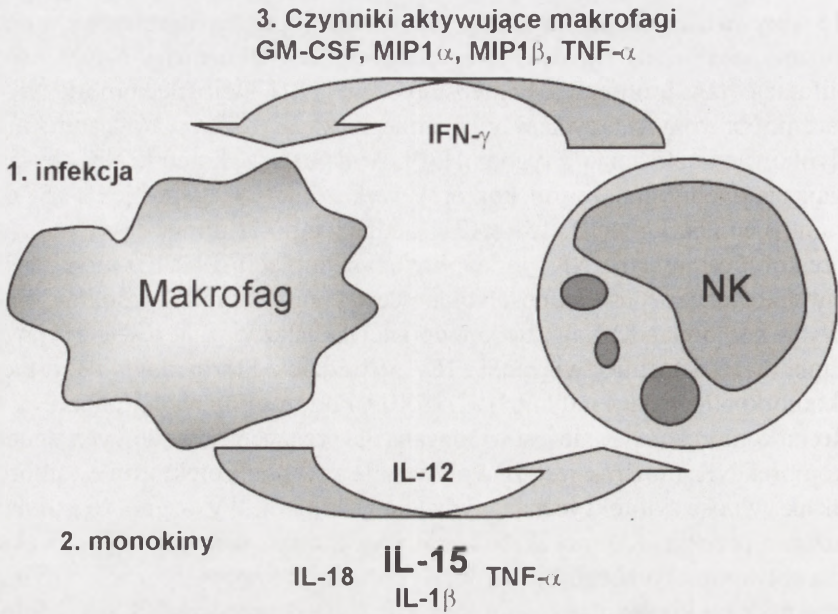
Przypuszczalnie, w warunkach fizjologicznych, komórki podścieliska dostarczają sygnałów niezbędnych do ekspresji receptorów KIR lub Ly-49 na komórkach NK. Pomimo że komórki podścieliska wykazują ekspresję mRNA kodującego IL-15, wydzielają jedynie niewielkie ilości IL-15 [95]. Wykazują jednak także ekspresję IL-15Rα. W kontekście ostatnich doniesień dotyczących ujawniania IL-15 na powierzchni błony komórkowej przez IL-15Rα można wysnuć przypuszczenia, że komórki podścieliska mogą dostarczać IL-15 prekursorom komórek NK w drodze kontaktu bezpośredniego [34]. Analogicznie wykazano, że fibroblasty pochodzące ze śledziony wykazują konstytutywną ekspresję IL-15/IL-15Rα, przez co mają wpływ na różnicowanie komórek CD34<sup>+</sup> do dojrzałych, wykazujących ekspresję KIR oraz właściwości cytotoksyczne komórek NK [17]. Być może, ekspresja receptorów KIR lub Ly-49 zależy od zdolności IL-15/IL-15Rα do pobudzania komórek prekursorowych niemających receptora IL-15Rα. Ponadto zasugerowano, że komórki NKpre mogą bezpośrednio indukować ekspresję IL-15 w komórkach podścieliska [56].



IL-15 wpływa także na podtrzymanie liczebności populacji dojrzałych komórek NK w organizmie przedłużając ich okres przeżycia, jak też stymulując ich powolną, podstawową proliferację (tzw. proliferację homeostatyczną) [114]. Dojrzałe komórki NK wykazują znacznie obniżony czas życia w organizmie myszy IL-15<sup>-/-</sup> w porównaniu z myszami niemodyfikowanymi (5 dni vs. 5 tygodni) [30]. Wydaje się, że komórki NK, aby przeżyć, wymagają ciągłych sygnałów od komórek wykazujących ekspresję IL-15R $\alpha$ , natomiast same nie muszą mieć IL-15R $\alpha$  [71]. Jedną z hipotez tłumaczących to zjawisko mówi, że komórki inne niż NK, pod wpływem stymulacji IL-15R $\alpha$  mogą wydzielać niezidentyfikowane rozpuszczalne lub błonowe czynniki, które bezpośrednio wpływają na przeżycie komórek NK. Najprawdopodobniej jednak związane jest to ze zjawiskiem ujawniania IL-15 w formie związanej z IL-15R $\alpha$ , dzięki której mogłyby zostać pobudzone komórki NK mające jedynie IL-2/15R $\beta\gamma$ . Podczas gdy wydaje się, że obecność IL-15R $\alpha$  na komórkach NK nie jest wymagana dla przeżycia obwodowych, spoczynkowych komórek NK, możliwe jest, że wpływa ona na funkcje efektorowe komórek NK, takie jak aktywność cytotoksyczna i wydzielanie cytokin. Wykazano, że istotną rolę w przedłużaniu przeżycia komórek NK odgrywa indukowana przez IL-15 ekspresja czynnika antyapoptotycznego Bcl-2 [30]. Działanie antyapoptotyczne IL-15 ma także znaczenie podczas kontaktu aktywowanych przez IL-2 komórek NK ze śródbłonkiem naczyń. W tych warunkach często podlegają one apoptozie, której zapobiega IL-15 [116].

IL-15 ma zdolność indukcji proliferacji dojrzałych komórek NK subpopulacji CD56<sup>bright</sup> [24], a *in vitro* pozwala im przeżyć nawet w pożywce bez surowicy [23]. Sama IL-15 nie jest jednak wystarczającym bodźcem, aby zapoczątkować proliferację dojrzałych komórek NK innych subpopulacji. Natomiast działając łącznie z IL-12 lub IL-10 silnie stymuluje ich podziały [133]. IL-15 istotnie nasila także właściwości cytotoksyczne i zdolność do cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC) komórek NK [24]. Przymuszcza jednym z mechanizmów zwiększania cytotoksyczności przez IL-15 jest indukcja ekspresji cząsteczki LFA-1 na komórkach NK, co wpływa na zdolność wiązania atakowanej komórki [11]. Wykazano także, że IL-15 działa bezpośrednio chemotaktycznie na komórki NK, jak również zwiększa ich właściwości adhezyjne do komórek śródbłonka naczyniowego [2].

IL-15, jeżeli działa samodzielnie, nie wywiera znaczącego wpływu na profil wydzielania cytokin przez komórki NK. Natomiast silnie pobudza wydzielanie cytokin działając równolegle z innymi monokinami – głównie z IL-12. Chociaż sama IL-15 wpływa jedynie w niewielkim stopniu na poziom wydzielania IFN- $\gamma$  przez komórki NK i limfocyty T, a działa pod tym względem synergistycznie z IL-18, IL-21 [122] oraz IL-12 [24], jest wręcz uważana za czynnik niezbędny do optymalnej produkcji IFN- $\gamma$  przez komórki NK [41]. Stosunkowo dobrze udokumentowano wydzielanie cytokin przez komórki NK stymulowane łącznie IL-15 i IL-12. Razem wzmagają wydzielanie IL-10, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$  [24, 44]. IL-15 w kombinacji z IL-18 optymalnie indukuje syntezę GM-CSF [44]. Ludzkie komórki NK pod wpływem IL-15 wydzielają liczne chemokiny: MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$  [15, 43], MCP-1 $\alpha$  oraz RANTES [28], które mogą działać chemotaktycznie na same komórki NK. Przymuszcza, opisany powyżej wpływ IL-15 na wydzielanie cytokin dotyczy głównie populacji CD56<sup>bright</sup> komórek NK [42]. Podobnie, jedynie te komórki reagują na bodziec



RYCINA 3. IL-15 uczestniczy w mechanizmach komunikacji pomiędzy aktywowanymi monocytami/makrofagami a komórkami NK

wynikający ze związania receptora CD94 w połączeniu ze stymulacją IL-15 produkując IFN- $\gamma$  oraz intensywnie proliferując [130].

Spostrzeżenia dotyczące produkcji cytokin przez komórki NK pod wpływem monokin nabierają szczególnego znaczenia podczas odpowiedzi zapalnej z udziałem monocytów/makrofagów i komórek NK (ryc. 3). Monocyt lub makrofag, w odpowiedzi na czynnik zakaźny wydziela m.in. monokiny: IL-15, IL-12, IL-18. Czynniki te wpływają synergistycznie na produkcję IFN- $\gamma$  przez komórki NK, co z kolei wzmacnia m.in. aktywność monocytów/makrofagów. Jednocześnie, IL-15 może uwrażliwiać komórki NK i limfocyty T na działanie IL-12 i IL-18 indukując na ich powierzchni ekspresję IL-12R $\beta$ 2 oraz IL18R [123]. Podobne znaczenie może mieć zaobserwowana ostatnio interakcja komórek NK z komórkami dendrytycznymi (DC) w obrębie drugorzędowych narządów limfatycznych [46]. Przypuszczalnie, IL-15 prezentowana przez DC w formie związanej z IL-15R $\alpha$  może odgrywać zasadniczą rolę w indukcji proliferacji komórek NK, natomiast wydzielana przez te same DC IL-12 wydaje się bezpośrednio wpływać na wydzielanie IFN- $\gamma$  przez komórki NK.

Jednym z modeli, na których badano oddziaływanie IL-15 na komórki NK, były komórki linii NK-92 (przypominające fenotypowo komórki NK CD56<sup>bright</sup>), do których wprowadzono gen dla IL-15 [141]. Transfekcja znacznie przyspieszyła tempo proliferacji tych komórek, co związane było ze zmianą zdolności do przylegania i ekspresji CD54, a także stanem aktywacji, który wyrażał się nadekspresją CD69. Wzrosła także ich cytotoksyczność przeciwko wielu liniom komórek nowotworowych, co prawdopodobnie było związane ze wzrostem ekspresji perforyny, FasL, IFN- $\gamma$ , receptora aktywującego NKG2D oraz obniżeniem ekspresji receptora hamującego NKG2A/CD94.



## LIMFOCYTY T

Odkrycie IL-15 związane było z jej zdolnością do stymulacji proliferacji linii limfocytów CTLL zależnych od IL-2 bądź limfocytów stymulowanych mitogenem, przy braku IL-2 [19, 54]. Została więc zidentyfikowana jako czynnik wzrostu limfocytów T, co świadczy o jej istotnym znaczeniu dla tej populacji komórek. Występujące fizjologicznie limfocyty T spoczynkowe wydają się być niewrażliwe na IL-15. Natomiast po aktywacji receptora TCR nabywają wrażliwości na IL-15, co prawdopodobnie może być związane z pojawieniem się ekspresji IL-15R $\alpha$  na ich powierzchni [40]. Taka stymulacja sprawia, że nabywają one ekspresji IL-2R $\alpha$ , IL-2/15R $\beta$ , FasL, CD30, TNFRII, CD40L, CD69 oraz CD94/NKG2A, natomiast obniża się poziom IL-15R $\alpha$ , co wiąże się z wtórnym zmniejszeniem wrażliwości na IL-15 [40]. U ludzi IL-15 wydaje się wpływać na proliferację limfocytów T pamięci CD8 $^+$  i CD4 $^+$  oraz limfocytów dziewiczych CD8 $^+$ , ale nie CD4 $^+$ , co związane jest z obecnością receptora IL-2/15R $\beta$  [67]. Natomiast u myszy, jak ostatnio wykazano, IL-15 zastosowana w wysokich dawkach może stymulować także proliferację limfocytów T CD4 $^+$  dziewiczych [100].

IL-15 jest czynnikiem chemotaktycznym dla limfocytów T izolowanych z ludzkiej krwi [135]. Oddziałując bezpośrednio na limfocyty T indukuje na nich ekspresję receptorów dla chemokin typu CC, jak również stymuluje wydzielanie chemokin należących do wszystkich grup (CC, CXC i C), m.in. RANTES, MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$  [109]. Dzięki indukcji ekspresji hialuronianu na komórkach śródbłonna naczyniowego (dla którego ligandem jest cząsteczka CD44 na powierzchni limfocytów), jak też zwiększając właściwości wiążące cząsteczek LFA-1 leukocytów [105], IL-15 nasila migrację limfocytów T przez śródbłonek naczyniowy. Podobnie, zaobserwowano, że myszy IL-15R $\alpha^{-/-}$  wykazują znaczną limfopenię, pomimo prawidłowego rozwoju limfocytów T i B, co wiąże się z osłabieniem proliferacji oraz migracji limfocytów T do węzłów chłonnych [81].

Najlepiej udokumentowany został wpływ IL-15 na limfocyty pamięci CD8 $^+$  (CD44 $^{\text{high}}$ ). Bezpośrednich dowodów dostarczają opisy myszy IL-15 $^{-/-}$  oraz IL-15R $\alpha^{-/-}$  [68, 81], mających wybitnie obniżoną liczbę limfocytów T pamięci CD8 $^+$ . Także po przebyciu infekcji wirusowej, odnotowano u nich znacznie obniżoną zarówno liczebność, jak też proliferację specyficznych w stosunku do antygeny limfocytów pamięci CD8 $^+$ , w porównaniu z myszami kontrolnymi [13, 119]. Na podstawie analizy populacji limfocytów w grasicy i na obwodzie u myszy IL-15 $^{-/-}$  zaproponowano model, według którego IL-15 nie jest czynnikiem niezbędnym dla rozwoju limfocytów CD8 $^+$ , może być natomiast wymagana dla ich namnażania i przeżycia [68]. Myszy transgeniczne (IL-15tg) mają bardzo liczną populację limfocytów T CD8 $^+$  pamięci, szczególnie po immunizacji [84, 137]. Najczęściej rozważa się bezpośrednie oddziaływanie IL-15 na limfocyty T pamięci CD8 $^+$ . Istnieją jednak także uzasadnione domniemania, że IL-15 wpływa na te komórki za pośrednictwem komórek dendrytycznych [35].

Wpływ IL-15 na liczebność limfocytów pamięci można rozpatrywać w trzech aspektach: (1) namnażania specyficznych antygenowo limfocytów CD8 $^+$  podczas odpowiedzi pierwotnej, (2) bezpośredniego wpływu na przeżycie limfocytów pamięci oraz (3)

odnowy ich populacji w wyniku powolnej proliferacji. Pomimo że niektórzy autorzy sugerują, że proces wymieniony w punkcie pierwszym może mieć istotne znaczenie [119], nie dostarczają jednak jednoznacznych na to dowodów. Obecnie uważa się, że IL-15 odgrywa rolę przede wszystkim w tzw. homeostatycznej proliferacji limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup> [13]. Jeśli limfocyty te przestają otrzymywać sygnały ze strony IL-15, ich liczba stopniowo zmniejsza się [53]. Natomiast podanie IL-15 w warunkach eksperymentalnych stymuluje proliferację limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup> zarówno *in vitro*, jak też *in vivo* [142]. Ostatnio wykazano, że IL-15 może utrzymywać homeostatyczną proliferację limfocytów T pamięci CD8<sup>+</sup> indukując w nich stabilną ekspresję telomerazy [78].

Populacje limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup> różnią się w zakresie zapotrzebowania na IL-15 i ekspresji IL-15R $\beta$  [48]. U myszy IL-15<sup>-/-</sup> oraz IL-15R $\alpha$ <sup>-/-</sup> występują nieliczne populacje limfocytów CD44<sup>high</sup>, które charakteryzują się relatywnie szybką proliferacją i zdolnością do wydzielania cytokin [65]. IL-15 wpływa także na liczebność limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup> działając bezpośrednio jako czynnik antyapoptotyczny. Zwiększa w nich ekspresję białka antyapoptotycznego Bcl-2 oraz Bcl-xL [14, 136], a komórki te stają się odporne na apoptozę indukowaną przez CD95/Fas [96]. W przeciwieństwie do IL-15, porównywana z nią często IL-2 hamuje proliferację limfocytów pamięci T CD8<sup>+</sup> [131].

Aktywność IL-15 jako czynnika nasilającego przeżycie limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup> może prowadzić także do zjawisk niepożądanych. Prawdopodobnie limfocyty pamięci mogą współzawodniczyć w naturalnych warunkach o IL-15, a wywołana przez IL-15 indukcja klonów limfocytów skierowanych przeciwko określonemu antygenowi może upośledzać funkcje istniejących już w organizmie limfocytów pamięci [29]. W wieku starszym, zarówno u ludzi jak i u myszy, zaobserwowano charakterystyczne, bardzo liczne klony limfocytów CD8<sup>+</sup>, podlegające bardzo powolnym podziałom, które do podtrzymania proliferacji wymagają IL-15 [72]. Możliwe jest, że współzawodniczą one z limfocytami pamięci CD8<sup>+</sup> o tą cytokinę, co może prowadzić do zwiększonej zapadalności na infekcje.

IL-15 jest nie tylko czynnikiem wzrostu i przeżycia limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup>, ale także aktywuje te komórki. Yajima i in. zasugerowali, że IL-15 odgrywa zasadniczą rolę już we wczesnych etapach aktywacji limfocytów T pamięci CD8<sup>+</sup> [138]. Może także je aktywować niezależnie od związania TCR. W podobnym stopniu co związanie receptora TCR indukuje ich cytotoxyczność, ekspresję cząsteczek efektorowych: IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , granzymu B i perforyny oraz proliferację [134]. Limfocyty T CD8<sup>+</sup> pamięci aktywowane za pomocą IL-15 wykazują także w 77% identyczną ekspresję genów, co aktywowane za pomocą TCR [80].

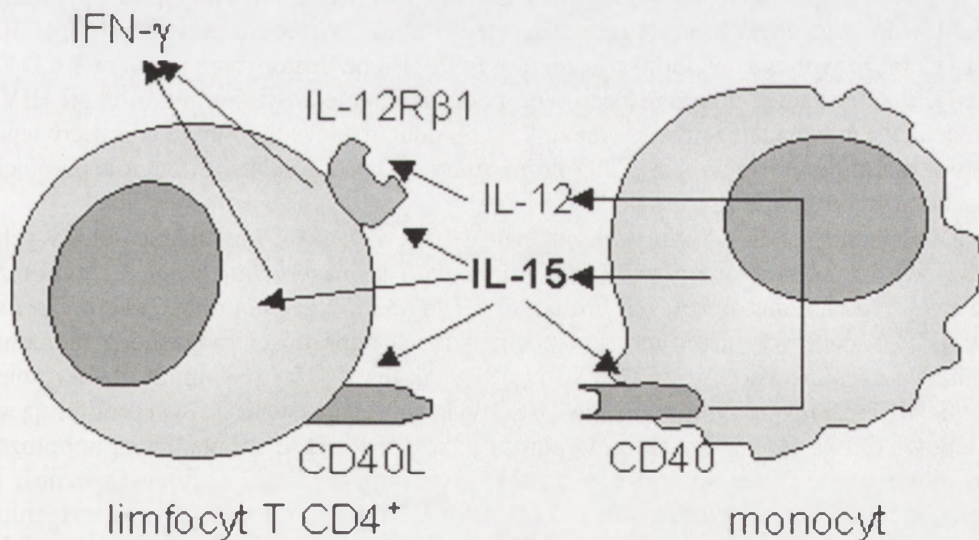
W toku badań nad rolą IL-15 w procesie homeostatycznej proliferacji limfocytów T CD8<sup>+</sup> wykazano, że zależy ona od ekspresji IL-15R $\alpha$  na powierzchni komórek innych niż limfocyty CD8<sup>+</sup>, przypuszczalnie komórek wywodzących się ze szpiku kostnego i komórek podścieliska [72, 118]. Pierwotnie sugerowano, że komórki mające IL-15R $\alpha$  mogłyby pod wpływem IL-15 wydzielać nieznaną czynnik oddziałujący na komórki pamięci CD8<sup>+</sup> [82]. Obecnie wydaje się, że ujawniają one limfocytom CD8<sup>+</sup> IL-15 związaną z receptorem IL-15R $\alpha$ , a proces ten ma znaczenie zarówno w warunkach fizjologicznych, jak też po podaniu egzogennej IL-15 [72, 118]. Rola receptora IL-15R $\alpha$  na samych limfocytach CD8<sup>+</sup> nie została jeszcze wyjaśniona. Podczas gdy dziewięć limfocytów CD8<sup>+</sup> nie wykazują jego



ekspresji, pojawia się on na komórkach aktywowanych i utrzymuje się na limfocytach pamięci  $CD8^+$  [119]. Chociaż IL-15R $\alpha$  nie ma większego znaczenia dla indukcji proliferacji ani wpływu IL-15 na przeżycie limfocytów, wydaje się, że znacznie wzmacnia wrażliwość tych komórek na niskie stężenia IL-15 [14, 118].

Znacznie mniej jest wiadomo o wpływie IL-15 na limfocyty dziewicze  $CD8^+$  ( $CD44^{low}$ ). Myszy IL-15 $^{-/-}$  oraz IL-15R $\alpha^{-/-}$  mają znacznie mniej liczne populacje dziewiczych limfocytów T [68, 81, 136]. U myszy IL-15R $\alpha^{-/-}$  może to być spowodowane upośledzeniem dojrzewania tych limfocytów w grasicy, ponieważ mają one znacznie obniżoną populację tymocytów „pojedynczo-pozytywnych”  $CD8^+$  [81]. Liczne badania dowodzą, że IL-15 nie wpływa na proliferację mysich limfocytów dziewiczych zarówno *in vitro*, jak *in vivo* [142]. IL-15 może natomiast przedłużać ich okres życia podwyższając poziom białka antyapoptotycznego Bcl-2 [14]. Jakkolwiek ludzkie dziewicze limfocyty T  $CD8^+$  reagują na IL-15 obniżając ekspresję CD45RA i CD28 (ale utrzymując CD27), nabywają właściwości cytotoksycznych, ekspresji perforyny i granzymu B, a także wydzielają cytokiny: IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  [4]. Jednak komórki te są stosunkowo mało wrażliwe na IL-15, prawdopodobnie dlatego że mają niską ekspresję IL-2/15R $\beta$  [48].

IL-15 odgrywa również istotną rolę w procesie dojrzewania powinowactwa limfocytów T  $CD8^+$  poprzez zwiększanie ekspresji  $CD8^+$  [102]. Limfocyty o największym powinowactwie do antygeny wykazują najwyższy poziom ekspresji IL-15R $\alpha$ , dzięki czemu utrzymują się dłużej w organizmie w wyniku homeostatycznej proliferacji.



RYCINA 4. Wpływ IL-15 na interakcje pomiędzy limfocytami T  $CD4^+$  a monocytami. Aktywowane za pomocą IL-15 limfocyty T  $CD4^+$  wykazują wysoką ekspresję cząsteczek CD40L/CD154. Jednocześnie, IL-15 może zwiększać ekspresję CD40 na powierzchni monocytów, a interakcja tych cząsteczek prowadzi do aktywacji monocytu oraz m.in. produkcji IL-12. IL-15 uwalnia też limfocyty T na IL-12 zwiększając ekspresję IL-12R $\beta$ 1. IL-12 synergistycznie z IL-15 wpływa m.in. na wydzielanie IFN- $\gamma$  [89]

IL-15 nie wpływa ani na proliferację, ani aktywację ludzkich limfocytów T CD4<sup>+</sup> dziewiczych [67, 120]. Jednak aktywowane limfocyty T CD4<sup>+</sup> nabywają wrażliwości na IL-15, która stymuluje ich proliferację [120], jak również indukuje ekspresję CD40L/CD154 na ich powierzchni [121]. Dzięki temu, mogą one aktywować komórki dendrytyczne, limfocyty B i monocyty (ryc. 4). IL-15 jest także jednym z czynników mających wpływ na różnicowanie limfocytów T CD4<sup>+</sup> w kierunku populacji typu Th1, charakteryzujących się produkcją IFN- $\gamma$  [100, 120].

Przypuszczalnie IL-15 odgrywa ważną rolę podczas pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, w końcowym okresie ekspansji specyficznych antygenowo limfocytów T CD4<sup>+</sup>, działając jako ich czynnik przeżycia. Zwykle, aktywowane antygenem limfocyty T CD4<sup>+</sup> rozpoczynają intensywną proliferację, związaną z odpowiedzią na produkowaną auto- i parakrynnie IL-2. Jeżeli w tym stadium ponownie zostaną pobudzone antygenem, na ich powierzchni pojawiają się cząsteczki FasL, co z kolei może prowadzić do ich śmierci w procesie zwanym AICD (*activation-induced cell death*) – śmierć komórki w wyniku aktywacji. IL-2 jest czynnikiem bezpośrednio przyczyniającym się do procesu AICD [131]. W przeciwieństwie do niej, IL-15 wpływa na przedłużenie przeżycia tych limfocytów hamując proces AICD [84]. Inne z kolei badania wykazały, że IL-15 może zapobiegać śmierci aktywowanych limfocytów CD4<sup>+</sup> sprawiając, że nabywają one fenotypu „komórek wyciszonych”, zatrzymują podziały komórkowe i obniżają ekspresję CD71, CD95 i CD25. Natomiast powstałe w ten sposób komórki, po ponownej stymulacji antygenowej bardzo intensywnie się dzielą, a także są odporne na śmierć indukowaną aktywacją TCR [33].

Limfocyty pamięci T CD4<sup>+</sup>, zarówno ludzkie jak i mysie, nabywają pod wpływem IL-15 zdolności do proliferacji oraz ekspresji niektórych markerów aktywacji [67, 100]. IL-15 może wpływać na indukcję receptora CXCR4 na limfocytach pamięci T CD4<sup>+</sup> [64], co może mieć znaczenie zarówno podczas chemotaksji, jak też infekcji HIV. Jednak ostatnie badania przeprowadzone na modelu mysim sugerują, że w przeciwieństwie do limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup>, homeostatyczna proliferacja limfocytów pamięci CD4<sup>+</sup> wydaje się nie zależeć od IL-15 [126].

Wykazano, że IL-15 wpływa zarówno na rozwój, jak i na funkcje jelitowych limfocytów śród nabłonkowych (iIEL – *intestinal intraepithelial lymphocytes*) oraz dendrytycznych naskórkowych limfocytów T $\gamma\delta$  (*dendritic epidermal TCR $\gamma\delta$  T cells* – DETC) biorących udział m.in. w mechanizmach odporności związanej z błonami śluzowymi. Zarówno myszy IL-15R $\alpha^{-/-}$  [81], jak też IL-15<sup>-/-</sup> [68] miały dwukrotnie mniej iIEL niż myszy typu „dzikiego”. iIEL wykazują ekspresję IL-15R $\alpha$  i proliferują w odpowiedzi na IL-15. Cytokina ta chroni je również przed spontaniczną apoptozą podnosząc w nich poziom Bcl-2 [57]. IL-15 stymuluje proliferację, cytotoksyczność i produkcję IFN- $\gamma$  przez ludzkie iIEL TCR $\gamma\delta$  [36]. Odgrywa także rolę we wzmaganiu przeżycia iIEL TCR $\alpha\beta$  w warunkach braku stymulacji antygenowej, jak również w ich namnażaniu i żywotności po stymulacji antygenem [76]. Liczne badania potwierdzają także, że IL-15 jest czynnikiem niezbędnym do wzrostu i przeżycia aktywowanych DETC oraz że może odgrywać rolę w ich lokalizacji w skórze [40].

IL-15 wpływa również na namnażanie oraz utrzymywanie się populacji komórek NKT [40]. Mysie komórki NKT proliferują w odpowiedzi na IL-15, a ich liczebność jest znacznie obniżona u myszy IL-15<sup>-/-</sup> [68], IL-15R $\alpha^{-/-}$  [81] oraz IL-2/15R $\beta^{-/-}$  [103].



## KOMÓRKI PREZENTUJĄCE ANTYGEN (APC)

Niestymulowane komórki dendrytyczne (DC) wydzielają IL-15 w niewielkich ilościach. Jednak jej produkcja znacznie wzrasta pod wpływem fagocytozy [62], stymulacji DC *in vitro* czynnikami imitującymi działanie czynnika infekcyjnego (dsRNA, LPS, IFN- $\alpha/\beta$ ) [88] oraz kostymulacji w drodze interakcji cząsteczki CD40 z ligandem [75]. Podobne sytuacje powodują wzrost ekspresji IL-15R $\alpha$  na DC [88]. W związku z tym wydaje się prawdopodobne, że produkcja IL-15 przez DC, a zwłaszcza jej ujawnianie przez te komórki w kompleksie z IL-15R $\alpha$  może mieć zasadnicze znaczenie w interakcjach DC z limfocytami T CD8<sup>+</sup> [117], komórkami NK [46] oraz limfocytami B [106].

Ponadto, równie istotny jest wpływ IL-15 na same komórki dendrytyczne. IL-15 jest uważana za czynnik niezbędny dla wczesnej aktywacji DC, dzięki której mogą one odpowiadać na IL-12, jak też same nabywają zdolności do jej produkcji [104]. Ekspozycja DC na IL-15 wpływa na wzrost ekspresji cząsteczek kostymulujących, produkcję IFN- $\gamma$  przez te komórki, jak też wzmacnia ich zdolność do stymulacji proliferacji specyficznych antygenowo limfocytów T CD8<sup>+</sup> [88]. Wykazano wręcz, że IL-15 ujawniana przez DC w kompleksie z IL-15R $\alpha$  jest absolutnie niezbędna do wykształcenia odpowiedzi typu Th1, ze strony limfocytów T CD8<sup>+</sup> [117]. Przynajmniej, w początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej, DC za pomocą działającej chemotaktycznie IL-15 mogą także przyciągać limfocyty T [62]. Ostatnie badania doniosły, że DC są zdolne do wydzielania IL-2 po kontakcie z patogenem [39]. Jednocześnie wykazano jednak, że zależy to od możliwości koekspresji IL-15 przez te komórki.

Według ostatnich doniesień, poprzez ekspozycję IL-15 w kompleksie z receptorem, DC odgrywają ważną rolę w regulacji proliferacji oraz przeżycia komórek NK, głównie subpopulacji CD56<sup>bright</sup> [46]. IL-15 może także indukować ekspresję cząsteczek MICA/B (*MHC class I-related chain A and B*) na powierzchni samych DC, które oddziałując z receptorami NKG2D stymulują komórki NK [60]. Podobną rolę przypisuje się IL-15/IL-15R $\alpha$  w interakcjach DC z limfocytami B, gdzie może wpływać ona na podtrzymanie przeżycia i proliferacji limfocytów B w centrach namnażania grudek chłonnych [106].

IL-15 może służyć także jako czynnik wzrostu i różnicowania komórek dendrytycznych z komórek hematopoetycznych CD34<sup>+</sup> [20]. Podobnie, za pomocą IL-15 można doprowadzić do różnicowania monocytów w komórki o cechach komórek Langerhansa [94]. Sytuacja taka może mieć miejsce w organizmie, gdzie IL-15 wydzielana jest przez keratynocyty. Mysie DC, do których różnicowania wykorzystywano GM-CSF oraz IL-15, mają zdolność do stymulacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>, a ponadto szczególnie efektywnej stymulacji limfocytów T CD8<sup>+</sup>, które wykazują dzięki temu silne właściwości cytotoksyczne [111]. Istnieją przypuszczenia, że interakcje DC z limfocytami pamięci T CD8<sup>+</sup>, w których pośredniczy wydzielana przez DC IL-15, leżą u podstaw procesu homeostatycznej proliferacji limfocytów [35].

DC transdukowane genem dla IL-15 wykazywały zwiększoną ekspresję cząsteczek CD83, CD86, CD40, IL-15R $\alpha$ , podwyższony poziom wydzielania IL-12 oraz wzmożone właściwości stymulacji proliferacji limfocytów T. Natomiast w bezpośrednim kontakcie

z komórkami nowotworowymi wykazywały oporność na indukowany przez komórki nowotworowe proces apoptozy [127].

Monocyty/makrofagi, podobnie jak DC, po stymulacji wydzielają IL-15 [25, 32, 93], ale cytokina ta może działać na nie także w sposób autokryny. Aktywowane makrofagi reagują na wysokie stężenia IL-15 syntezą cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), jak też przeciwzapalnych (IL-10). Jednak bardzo niskie stężenia IL-15 mogą wręcz hamować wydzielanie cytokin prozapalnych, ale nie przeciwzapalnych przez makrofagi [3]. Pod wpływem IL-15, monocyty mogą wydzielać IL-8 i MCP-1, działające chemotaktycznie na neutrofile [9]. Bardzo istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej odgrywają interakcje pomiędzy monocytami a limfocytami T, które zilustrowano na rycinie 4. Ponadto dowiedziono, że IL-15 może zwiększać ekspresję cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 na powierzchni makrofagów, wpływając tym samym na wzrost ich zdolności do prezentacji antygenów, ale też zdolności do wydzielania IFN- $\gamma$  i samej IL-15 [1]. Zgodnie z ostatnimi doniesieniami, po związaniu IL-15 prezentowanej przez IL-15R $\alpha$  na powierzchni monocytów dochodzi także do wstecznego przekazywania sygnału w tych komórkach [99]. Prowadzi to do adhezji monocytów, w co zaangażowane są GTP-azy, aktywacji kinaz ERK-1 i 2, p38 i MAPK, jak też wydzielania IL-8 przez monocyty.

Przypuszczalnie, IL-15 może także wpływać na bezpośredni efekt cytotoksyczny/cytostatyczny wywierany przez monocyty i makrofagi. IL-15 może indukować syntezę NO oraz IFN- $\beta$  przez linię komórek makrofagalnych RAW 264.7 [79]. Badano wpływ IL-15 na aktywność monocytów w walce z grzybami. Monocyty stymulowane IL-15 wykazywały wzrost cytotoksyczności przeciwko *C. albicans* oraz przejściowy wzrost produkcji rodników tlenowych [129]. Jednak nie wpływało to na ich zdolność do fagocytozy ani na produkcję TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , jak też IL-12. IL-15 działając na makrofagi bezpośrednio lub pośrednio, przez indukcję IL-12, wzmagala także ich aktywność przeciwko *Leishmania donovani* [31].

## LIMFOCYTY B

IL-15 wydaje się nie wpływać na spoczynkowe limfocyty B, natomiast działając na limfocyty B aktywowane, *in vitro* stymuluje ich proliferację oraz produkcję immunoglobulin [128]. Podobnie w organizmie, DC grudkowe prezentują IL-15 w formie związanej z IL-15R $\alpha$  stymulowanym antygenem limfocytom B z centrów rozmnażania grudek chłonnych, wydłużając ich przeżycie i wpływając na proliferację [106]. IL-15 wpływa ponadto na produkcję przeciwciał przez limfocyty B stymulowane za pomocą CD40L [8]. Stymulacja wydzielania przeciwciał przez IL-15 może być współodpowiedzialna za hipergammaglobulinemię towarzyszącą niekiedy infekcji HIV [66]. Wydaje się, że IL-15 jest także ważnym czynnikiem dla różnicowania w błonach śluzowych limfocytów B1 do komórek wydzielających IgA [55]. Podobnie jak w przypadku limfocytów T, IL-15 działając na limfocyty B podwyższa na nich ekspresję IL-2R $\alpha$ , natomiast obniża ekspresję swojego receptora IL-15R $\alpha$  [73].



## GRANULOCYTY

Granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) wykazują ekspresję zarówno IL-15R $\beta$  i  $\gamma$  [50], jak i IL-15R $\alpha$  [49]. Wykazano, że pod wpływem IL-15 dochodzi do zmiany ich kształtu, charakterystycznej dla aktywacji tych komórek [50]. Zwiększa się ich aktywność fagocytarna [50, 97], jak też synteza mRNA i białek [50]. Nie dochodzi jednak do nasilenia odpowiedzi związanej z produkcją rodników tlenowych [50, 86]. Działając na neutrofile, IL-15 zwiększa ich chemotaksję oraz zdolności zabijania grzybów [86], jak również wpływa na przedłużenie ich przeżycia [50]. W proces hamowania apoptozy neutrofilów pod wpływem IL-15 zaangażowane są kinazy JAK2, JAK3, p38, MAPK oraz ERK. IL-15 zapobiega też spadkowi poziomu białka antyapoptotycznego Mcl-1 [108]. Ostatnio wykazano, że IL-15 wpływa na wzrost ekspresji cząsteczek CD11b i CD18 (będących składowymi integryny Mac-1) na neutrofilach. W związku z podobnymi zmianami indukowanymi na powierzchni nabłonka oddechowego, IL-15 może być przyczyną naciekania dróg oddechowych przez granulocyty obojętnochłonne [107].

IL-15 może pośrednio wpływać na chemotaksję neutrofilów stymulując wydzielanie przez monocyty chemokin IL-8 i MCP-1 [9]. Działając bezpośrednio na neutrofile aktywuje w nich czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B oraz wydzielanie IL-8 [89, 97]. Jednak, w przeciwieństwie do oddziaływania na monocyty, IL-15 hamuje wydzielanie IL-8 i MCP-1 przez enterocyty, dzięki czemu może zmniejszać naciek neutrofilów w ścianie jelita [83]. Wykazano, że IL-15 podana razem z IL-18 indukuje wydzielanie rozpuszczalnego receptora dla IL-6: sgp130 [58] oraz IL-1R $\alpha$  [16] przez neutrofile, co także może działać przeciwnie.

## KOMÓRKI I TKANKI NIENALEŻĄCE DO UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

IL-15 jest produkowana w niewielkich ilościach przez miocyty, ale jest też czynnikiem działającym na nie anabolicznie [113]. Pod jej wpływem, miocyty gromadzą białka kurczliwe [113]. IL-15 wpływa także na różnicowanie szczyrzych mioblastów [112], jak również zapobiega utracie masy mięśniowej przez szczury w stanie kachekcji wywołanej nowotworem, hamując apoptozę miocytów [22]. IL-15 jest także czynnikiem różnicowania osteoklastów, co może mieć znaczenie w procesie erozji kości w reumatoidalnym zapaleniu stawów [101]. Wpływ IL-15 na komórki tuczne, wykazujące ekspresję IL-15R $\alpha$ , nie został jeszcze dobrze zbadany. Dowiedziono jedynie, że hamuje ona apoptozę tych komórek indukując czynnik antyapoptotyczny Bcl-xL [87]. IL-15 jest zarówno produkowana przez komórki nabłonka jelitowego, jak też jest dla nich czynnikiem wzrostowym [115]. IL-15, działając bezpośrednio na enterocyty – jak wspomniano wyżej – hamuje wydzielanie przez nie IL-8 i MCP-1, co może zmniejszać nacieki nabłonka jelitowego przez neutrofile [83]. Oddziałując na znajdujące się w ścianie jelita limfocyty IEL, IL-15 ma bezpośredni wpływ na pierwszą linię obrony przeciwko patogenom. Dowiedziono jednak, że aktywowane

przez wydzielaną przez enterocyty IL-15 limfocyty śród nabłonkowe, szczególnie wykazujące ekspresję markerów komórek NK, mogą jednocześnie przyczyniać się do śmierci enterocytów [69].

Nierozstrzygnięta jest rola IL-15 w rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego. Gen dla IL-15 podlega konstytutywnej ekspresji w tkance nerwowej, a w trakcie różnicowania neuronów wykryto w nich dwie odmienne izoformy mRNA dla IL-15. Wykazano, że w fizjologicznych warunkach IL-15 jest obecna jedynie w neuronach, natomiast komórki gleju zawierają ją jedynie wtedy, gdy zostaną aktywowane czynnikami zapalnymi [85]. Dlatego ludzkie astrocyty i komórki mikrogleju, które wykazują nieznaczną ekspresję IL-15, po stymulacji cytokinami prozapalnymi znacznie zwiększają jej syntezę [77].

Łożysko jest bogatym źródłem IL-15. Przepuszczalnie ma ona wpływ na proces inwazyjnego wzrostu cytotrofoblastu. Wykazano bezpośredni wpływ IL-15 na zdolność do inwazji oraz migracji komórek cytotrofoblastu, ale nie proliferacji. Pod wpływem IL-15 wydzielają one metaloproteinazę typu 1 [143].

Udowodniono również aktywność proangiogenną IL-15 *in vivo* [7, 74], jak też działanie antyapoptotyczne na komórki śródbłonna naczyniowego [139].

## PODSUMOWANIE

IL-15 odgrywa bardzo istotną rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego, a co z tym się wiąże, także całego organizmu. Jej ekspresja podlega ścisłej kontroli, a organizm wykorzystuje określone sposoby, aby zwiększyć specyficzność jej działania. W literaturze opisywane jest szereg schorzeń, w których patogenezie istotną rolę odgrywa IL-15. Są to zwłaszcza niektóre choroby z autoagresji, ale także infekcje wirusowe, choroby alergiczne, zjawiska związane z przeszczepianiem komórek lub tkanek oraz niektóre choroby nowotworowe. Jednocześnie, w wielu prowadzonych badaniach próbuje się wykorzystać potencjał IL-15 do walki m.in. z nowotworami oraz infekcją wirusem HIV. Zagadnienia te będą przedmiotem odrębnego opracowania.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AGOSTINI C, ZAMBELLO R, FACCO M, PERIN A, PIAZZA F, SIVIERO M, BASSO U, BORTOLIN M, TRENTIN L, SEMENZATO G. CD8 T-cell infiltration in extravascular tissues of patients with human immunodeficiency virus infection. Interleukin-15 upmodulates costimulatory pathways involved in the antigen-presenting cells-T-cell interaction. *Blood* 1999; **93**: 1277–1286.
- [2] ALLAVENA P, GIARDINA G, BIANCHI G, MANTOVANI A. IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J Leukoc Biol* 1997; **61**: 729–735.
- [3] ALLEVA DG, KASER SB, MONROY MA, FENTON MJ, BELLER DI. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J Immunol* 1997; **159**: 2941–2951.



- [4] ALVES NL, HOOIBRINK B, AROSA FA, van LIER RA. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro*. *Blood* 2003; **102**: 2541–2546.
- [5] ANDERSON DM, JOHNSON L, GLACCUM MB, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, VALENTINE V, KIRSTEIN MN, SHAPIRO DN, MORRIS SW et al. Chromosomal assignment and genomic structure of IL15. *Genomics* 1995; **25**: 701–706.
- [6] ANDERSON DM, KUMAKI S, AHDIEH M, BERTLES J, TOMETSKO M, LOOMIS A, GIRI J, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 29862–29869.
- [7] ANGIOLILLO AL, KANEGANE H, SGADARI C, REAMAN GH, TOSATO G. Interleukin-15 promotes angiogenesis *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **233**: 231–237.
- [8] ARMITAGE RJ, MACDUFF BM, EISENMAN J, PAXTON R, GRABSTEIN KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995; **154**: 483–490.
- [9] BADOLATO R, PONZI AN, MILLESIMO M, NOTARANGELO LD, MUSSO T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood* 1997; **90**: 2804–2809.
- [10] BAMFORD RN, DEFILIPPIS AP, AZIMI N, KURYS G, WALDMANN TA. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J Immunol* 1998; **160**: 4418–4426.
- [11] BARAO I, HUDIG D, ASCENSAO JL. IL-15-mediated induction of LFA-1 is a late step required for cytotoxic differentiation of human NK cells from CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>bone marrow cells. *J Immunol* 2003; **171**: 683–690.
- [12] BAZAN JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6934–6938.
- [13] BECKER TC, WHERRY EJ, BOONE D, MURALI KRISHNA K, ANTIA R, MA A, AHMED R. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 2002; **195**: 1541–1548.
- [14] BARARD M, BRANDT K, BULFONE-PAUS S, TOUGH DF. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2003; **170**: 5018–5026.
- [15] BLUMAN EM, BARTYNSKI KJ, AVALOS BR, CALIGIURI MA. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2722–2727.
- [16] BOUCHARD A, RATTHE C, GIRARD D. Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J Leukoc Biol* 2004; **75**: 893–900.
- [17] BRIARD D, BROUTY-BOYE D, AZZARONE B, JASMIN C. Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15. *J Immunol* 2002; **168**: 4326–4332.
- [18] BULFONE-PAU SS, BULANOVA E, POHL T, BUDAGIAN V, DURKOP H, RUCKERT R, KUNZENDORF U, PAUS R, KRAUSE H. Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain. *Faseb J* 1999; **13**: 1575–1585.
- [19] BURTON JD, BAMFORD RN, PETERS C, GRANT AJ, KURYS G, GOLDMAN CK, BRENNAN J, ROESSLER E, WALDMANN TA. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4935–4939.
- [20] BYKOVSKAIA SN, BUFFO M, ZHANG H, BUNKER M, LEVITT ML, AGHA M, MARKS S, EVANS C, ELLIS P, SHURIN MR, SHOGAN J. The generation of human dendritic and NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 659–666.
- [21] CARAYOL G, ROBIN C, BOURHIS JH, BENNACEUR-GRISCELLI A, CHOUAIB S, COULOMBEL L, CAIGNARD A. NK cells differentiated from bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells exhibit similar phenotype and functions. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 1991–2002.
- [22] CARBO N, LOPEZ-SORIANO J, COSTELLI P, BUSQUETS S, ALVAREZ B, BACCINO FM, QUINN LS, LOPEZ-SORIANO J, ARGILES JM. Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. *Br J Cancer* 2000; **83**: 526–531.
- [23] CARSON WE, FEHNIGER TA, HALDAR S, ECKHERT K, LINDEMANN MJ, LAI CF, CROCE CM, BAUMANN H, CALIGIURI MA. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 1997; **99**: 937–943.

- [24] CARSON WE, GIRI JG, LINDEMANN MJ, LINETT ML, AHDIEH M, PAXTON R, ANDERSON D, EISENMAN J, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; **180**: 1395–1403.
- [25] CARSON WE, ROSS ME, BAIOCCHI RA, MARIEN MJ, BOIANI N, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2578–2582.
- [26] CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, DE COENE C, SELZ F, LE DEIST F, FISCHER A. Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from gamma c transduced severe combined immunodeficiency X1 bone marrow cells. *Blood* 1996; **88**: 3901–3909.
- [27] CHAE DW, NOSAKA Y, STROM TB, MASLINSKI W. Distribution of IL-15 receptor alpha-chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *J Immunol* 1996; **157**: 2813–2819.
- [28] CHANG KH, KIM JM, YOO NC, KIM WH, PARK JH, CHOI IH, KIM HS, LEE KW, SONG YG, HONG SK, KIM HY. Restoration of P-glycoprotein function is involved in the increase of natural killer activity with exogenous interleukin-15 in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Yonsei Med J* 2000; **41**: 600–606.
- [29] CHAPDELAIN Y, SMITH DK, PEDRAS-VASCONCELOS JA, KRISHNAN L, SAD S. Increased CD8+ T cell memory to concurrent infection at the expense of increased erosion of pre-existing memory: the paradoxical role of IL-15. *J Immunol* 2003; **171**: 5454–5460.
- [30] COOPER MA, BUSH JE, FEHNIGER TA, VANDEUSEN JB, WAITE RE, LIU Y, AGUILA HL, CALIGIURI MA. *In vivo* evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 2002; **100**: 3633–3638.
- [31] D'AGOSTINO P, MILANO S, ARCOLEO F, DI BELLA G, LA ROSA M, FERLAZZO V, CARUSO R, CHIFARI N, VITALE G, MANSUETO S, CILLARI E. Interleukin-15, as interferon-gamma, induces the killing of *Leishmania infantum* in phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing interleukin-12. *Scand J Immunol* 2004; **60**: 609–614.
- [32] DOHERTY TM, SEDER RA, SHER A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 1996; **156**: 735–741.
- [33] DOOMS H, DESMEDT M, VANCAENEGHEM S, ROTTIERS P, GOOSSENS V, FIERIS W, GROOTEN J. Quiescence-inducing and antiapoptotic activities of IL-15 enhance secondary CD4+ T cell responsiveness to antigen. *J Immunol* 1998; **161**: 2141–2150.
- [34] DUBOIS S, MARINER J, WALDMANN TA, TAGAYA Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity* 2002; **17**: 537–547.
- [35] DUBOIS SP, WALDMANN TA, MULLER JR. Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 8662–8667.
- [36] EBERT EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1998; **115**: 1439–1445.
- [37] EICHER DM. IL-2 and IL-15 manifest opposing effects on activation of nuclear factor of activated T cells. *Cell Immunol* 2003; **223**: 133–142.
- [38] ESTESS P, NANDI A, MOHAMADZADEH M, SIEGELMAN MH. Interleukin 15 induces endothelial hyaluronan expression *in vitro* and promotes activated T cell extravasation through a CD44-dependent pathway *in vivo*. *J Exp Med* 1999; **190**: 9–19.
- [39] FEAU S, FACCHINETTI V, GRANUCCI F, CITTERIO S, JARROSSAY D, SERESINI S, PROTTI MP, LANZAVECCHIA A, RICCIARDI-CASTAGNOLI P. Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. *Blood* 2005; **105**: 697–702.
- [40] FEHNIGER TA, CALIGIURI MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; **97**: 14–32.
- [41] FEHNIGER TA, CARSON WE, CALIGIURI MA. Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production. *Transplant Proc* 1999; **31**: 1476–1478.
- [42] FEHNIGER TA, COOPER MA, CALIGIURI MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**: 169–183.
- [43] FEHNIGER TA, HERBEIN G, YU H, PARA MI, BERNSTEIN ZP, O'BRIEN WA, CALIGIURI MA. Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol* 1998; **161**: 6433–6438.



- [44] FEHNIGER TA, SHAH MH, TURNER MJ, VANDEUSEN JB, WHITMAN SP, COOPER MA, SUZUKI K, WECHSER M, GOODSAD F, CALIGIURI MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999; **162**: 4511–4520.
- [45] FEHNIGER TA, SUZUKI K, PONNAPPAN A, VANDEUSSEN JB, COOPER MA, FLOREA SM, FREUD AG, ROBINSON ML, DURBIN J, CALIGIURI MA. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 2001; **193**: 219–231.
- [46] FERLAZZO G, PACK M, THOMAS D, PALUDAN C, SCHMID D, STROWIG T, BOUGRAS G, MULLER WA, MORETTA L, MUNZ C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 16606–16611.
- [47] GAGGERO A, AZZARONE B, ANDREI C, MISHAL Z, MEAZZA R, ZAPPIA E, RUBARTELLI A, FERRINI S. Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 1265–1274.
- [48] GEGINAT J, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003; **101**: 4260–4266.
- [49] GIRARD D, BOIANI N, BEAULIEU AD. Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; **88**: 232–240.
- [50] GIRARD D, PAQUET ME, PAQUIN R, BEAULIEU AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 1996; **88**: 3176–3184.
- [51] GIRI JG, AHDIEH M, EISENMAN J, SHANEBECK K, GRABSTEIN K, KUMAKI S, NAMEN A, PARK LS, COSMAN D, ANDERSON D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 1994; **13**: 2822–2830.
- [52] GIRI JG, KUMAKI S, AHDIEH M, FRIEND DJ, LOOMIS A, SHANEBECK K, DUBOSE R, COSMAN D, PARK LS, ANDERSON DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *Embo J* 1995; **14**: 3654–3663.
- [53] GOLDRATH AW, SIVAKUMAR PV, GLACCUM M, KENNEDY MK, BEVAN MJ, BENOIST C, MATHIS D, BUTZ EA. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 2002; **195**: 1515–1522.
- [54] GRABSTEIN KH, EISENMAN J, SHANEBECK K, RAUCH C, SRINIVASAN S, FUNG V, BEERS C, RICHARDSON J, SCHOENBORN MA, AHDIEH M et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; **264**: 965–968.
- [55] HIROI T, YANAGITA M, OHTA N, SAKAUE G, KIYONO H. IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses. *J Immunol* 2000; **165**: 4329–4337.
- [56] IIZUKA KD, CHAPLIN DD, WANG Y, WU Q, PEGG LE, YOKOYAMA WM, FU YX. Requirement for membrane lymphotoxin in natural killer cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6336–6340.
- [57] INAGAKI-OHARA K, NISHIMURA H, MITANI A, YOSHIKAI Y. Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 2885–2891.
- [58] JABLONSKA E, MARCINCZYK M. Role of interleukin-15 and interleukin-18 in the secretion of sIL-6R and sgp130 by human neutrophils. *Mediators Inflamm* 2003; **12**: 179–183.
- [59] JALECO AC, BLOM B, RES P, WEIJER K, LANIER LL, PHILLIPS JH, SPITS H. Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for development of CD34<sup>+</sup> cells into T cells. *J Immunol* 1997; **159**: 694–702.
- [60] JINUSHI M, TAKEHARA T, TATSUMI T, KANTO T, GROH V, SPIES T, SUZUKI T, MIYAGI T, HAYASHI N. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; **171**: 5423–5429.
- [61] JOHNSTON JA, BACON CM, FINBLOOM DS, REES RC, KAPLAN D, SHIBUYA K, ORTALDO JR, GUPTA S, CHEN YQ, GIRI JD ET AL. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8705–8709.

- [62] JONULEIT H, WIEDEMANN K, MULLER G, DEGWER T, HOPPE U, KNOP J, ENK H. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J Immunol* 1997; **158**: 2610–2615.
- [63] JOSHI PC, ZHOU X, CUCHENS M, JONES Q. Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common gamma-chain. *J Immunol* 2001; **166**: 885–891.
- [64] JOURDAN P, VENDRELL JP, HUGUET MF, SEGONDY M, BOUSQUET J, PENE J, YSSEL H. Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells. *J Immunol* 2000; **165**: 716–724.
- [65] JUDGE AD, ZHANG X, FUJII H, SURH CD, SPRENT J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* 2002; **196**: 935–946.
- [66] KACANI L, STOIBER H, DIERICH MP. Role of IL-15 in HIV-1-associated hypergammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1997; **108**: 14–18.
- [67] KANEGANE H, TOSATO G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* 1996; **88**: 230–235.
- [68] KENNEDY MK, GLACCUM M, BROWN SN, BUTZ EA, VINEY JL, EMBERS M, MATSUKI N, CHARRIER K, SEDGER L, WILLIS CR, BRASEL K, MORRISSEY JP, STOCKING K, SCHOH JC, JOYCE S, PESCHON JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000; **191**: 771–780.
- [69] KINOSHITA N, HIROI T, OHTA N, FUKUYAMA S, PARK EJ, KIYONO H. Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J Immunol* 2002; **169**: 6187–6192.
- [70] KOBAYASHI H, DUBOIS S, SATO N, SABZEVARI H, SAKAI Y, WALDMANN TA, TAGAYA Y. The role of trans-cellular IL-15-presentation in the activation of NK-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* 2005; **105**: 721–727.
- [71] KOKA R, BURKETT PR, CHIEN M, CHAIS, CHAN F, LODOLCE JP, BOONE DL, MA A. Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *J Exp Med* 2003; **197**: 977–984.
- [71a] KOSMARZEWSKA A, FRYDECKA I, CISZAK L, BOĆKO D. Struktura i biologia kompleksu receptora limfocytów T (TCR/CD3). *Post Biol Kom* 2001; **28**: 161–183.
- [72] KU CC, KAPPLER J, MARRACK P. The growth of the very large CD8+ T cell clones in older mice is controlled by cytokines. *J Immunol* 2001; **166**: 2186–2193.
- [73] KUMAKI S, ARMITAGE R, AHDIEH M, PARK L, COSMAN D. Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 1235–1239.
- [74] KUNIYASU H, OHMORI H, SASAKI T, SASAHIRA T, YOSHIDA K, KITADAY Y, FIDLER IJ. Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 4802–4810.
- [75] KUNIYOSHI JS, KUNIYOSHI CJ, LIM AM, WANG FY, BADE ER, LAUR, THOMAS EK, WEBER JS. Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells. *Cell Immunol* 1999; **193**: 48–58.
- [76] LAI YG, GELFANOV V, GELFANOVA V, KULIK L, CHU CL, JENG SW, LIAO NS. IL-15 promotes survival but not effector function differentiation of CD8+ TCRalpha beta+ intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1999; **163**: 5843–5850.
- [77] LEE YB, SATOH J, WALKER DG, KIM SU. Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport* 1996; **7**: 1062–1066.
- [78] LI Y, ZHI W, WARESKI P, WENG NP. IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8+ T cells *in vitro*. *J Immunol* 2005; **174**: 4019–4024.
- [79] LIU G, ZHAI Q, SCHAFFNER D, BRADBURN C, WU A, HAYFORD A, POPOV S, GRENE C, BAILEY C, ALIBEK K. IL-15 induces IFN-beta and iNOS gene expression, and antiviral activity of murine macrophage RAW 264.7 cells. *Immunol Lett* 2004; **91**: 171–178.
- [80] LIU K, CATALFAMO M, LI Y, HENKART PA, WENG NP. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6192–6197.
- [81] LODOLCE JP, BOONE DL, CHAI S, SWAIN RE, DASSOPOULOS T, TRETTIN S, MA A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; **9**: 669–676.



- [82] LODOLCE JP, BURKETT PR, BOONE DL, CHIEN M, MA A. T cell-independent interleukin 15/Ralpha signals are required for bystander proliferation. *J Exp Med* 2001; **194**: 1187–1194.
- [83] LUGERING N, KUCHARZIK T, MAASER C, KRAFT M, DOMSCHKE W. Interleukin-15 strongly inhibits interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 production in human colonic epithelial cells. *Immunology* 1999; **98**: 504–509.
- [84] MARKS-KONCZALIK J, DUBOIS S, LOSI JM, SABZEVARI H, YAMADA N, FEIGENBAUM L, WALDMANN TA, TAGAYA Y. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11445–11450.
- [85] MASLINSKA D. The cytokine network and interleukin-15 (IL-15) in brain development. *Folia Neuro-pathol* 2001; **39**: 43–47.
- [86] MASTROIANNI CM, D'ETTORRE G, FORCINA G, LICHTNER M, MENGONI F, D'AGOSTINO C, CORPOLONGO A, MASSETTI P, VULLO V. Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000; **96**: 1979–1984.
- [87] MASUDA A, MATSUGUCHI T, YAMAKI K, HAYAKAWA T, YOSHIKAI Y. Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *J Biol Chem* 2001; **276**: 26107–26113.
- [88] MATTEI F, SCHIAVONI G, BELARDELLI F, TOUGH DF. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol* 2001; **167**: 1179–1187.
- [89] MCDONALD PP, RUSSO MP, FERRINI S, CASSATELLA MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 1998; **92**: 4828–4835.
- [90] MEAZZA R, VERDIANI S, BIASSONI R, COPPOLECCHIA M, GAGGERO A, ORENZO AM, COLOMBO MP, AZZARONE B, FERRINI S. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 1996; **12**: 2187–2192.
- [91] MINGARI MC, VITALE C, CANTONI C, BELLOMO R, PONTE M, SCHIAVETTI F, BERTONE S, MORETTA A, MORETTA L. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1374–1380.
- [92] MIYAZAKI T, LIU ZJ, KAWAHARA A, MINAMI Y, YAMADA K, TSUJIMOTO Y, BARSOUMIAN EL, PERMUTTER RM, TANIGUCHI T. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 1995; **81**: 223–231.
- [93] MODY CH, SPURRELL JC, WOOD CJ. Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes. *J Infect Dis* 1998; **178**: 803–814.
- [94] MOHAMADZADEH M, BERARD F, ESSERT G, CHALOUNI C, PULENDRAN B, DAVOUST J, BRIDGES G, PALUCKA AK, BANCHEREAU J. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* 2001; **194**: 1013–1020.
- [95] MROZEK E, ANDERSON P, CALIGIURI MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; **87**: 2632–2640.
- [96] MUELLER YM, MAKAR V, BOJCZUK PM, WITEK J, KATSIKIS PD. IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int Immunol* 2003; **15**: 49–58.
- [97] MUSSO T, CALOSSO L, ZUCCA M, MILLESIMO M, PULITI M, BULFONE-PAUS S, MERLINO C, SAVOIA D, CAVALLO R, PONZI AN, BADOLATO R. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect Immun* 1998; **66**: 2640–2647.
- [98] MUSSO T, CALOSSO L, ZUCCA M, MILLESIMO M, RAVARINO D, GIOVARELLI M, MALAVASI F, PONZI AN, PAUS R, BULFONE-PAUS R. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 1999; **93**: 3531–3539.
- [99] NEELY GG, EPELMAN S, MA LL, COLARUSSO P, HOWLETT CJ, AMANKWAH EK, MCINTYRE AC, ROBBINS SM, MOODY CH. Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling. *J Immunol* 2004; **172**: 4225–4234.
- [100] NIEDBALA W, WEI X, LIEW FY. IL-15 induces type 1 and type 2 CD4+ and CD8+ T cells proliferation but is unable to drive cytokine production in the absence of TCR activation or IL-12/IL-4 stimulation *in vitro*. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 341–347.
- [101] OGATA Y, KUKITA A, KUKITA T, KOMINE M, MIYAHARA A, MIYAZAKI S, KOHASHI O. A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J Immunol* 1999; **162**: 2754–2760.
- [102] OH S, PERERA LP, BURKE DS, WALDMANN TA, BERZOFSKY JA. IL-15/IL-15/Ralpha-mediated avidity maturation of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 15154–15159.

- [103] OHTEKI T, HO S, SUZUKI H, MAK TW, OHASHI PS. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* 1997; **159**: 5931–5935.
- [104] OHTEKI T, SUZUE K, MAKI C, OTA T, KOYASU S. Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat Immunol* 2001; **2**: 1138–1143.
- [105] OPPENHEIMER-MARKS N, BREZINSCHKE RI, MOHAMADZADEH M, VITA R, LIPSKY PE. Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells *in vitro* and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model *in vivo*. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1261–1272.
- [106] PARK CS, YOON SO, ARMITAGE RJ, CHOI YS. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol* 2004; **173**: 6676–6683.
- [107] PELLETIER M, GIRARD D. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 2005; **141**: 315–325.
- [108] PELLETIER M, RATTHE C, GIRARD D. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett* 2002; **532**: 164–170.
- [109] PERERA LP, GOLDMAN CK, WALDMANN TA. IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J Immunol* 1999; **162**: 2606–2612.
- [110] PETIT DK, BONNERT TP, EISENMAN J, SRINIVASAN S, PAXTON R, BEERS C, LYNCH D, MILLER B, YOST J, GRABSTEIN KH, GOMBOTZ WR. Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2312–2318.
- [111] PULENDRAN B, DILLON S, JOSEPH C, CURIEL T, BANCHEREAU J, MOHAMADZADEH M. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8+ Tc1 responses *in vivo*. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 66–73.
- [112] QUINN LS, HAUGK KL, DAMON SE. Interleukin-15 stimulates C2 skeletal myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **239**: 6–10.
- [113] QUINN LS, HAUGK KL, GRABSTEIN KH. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 1995; **136**: 3669–3672.
- [114] RANSON T, VOSSHEINRICH CA, CORCUFF E, RICHARD O, MULLER W, DI SANTO JP. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 2003; **101**: 4887–4893.
- [115] REINECKER HC, MACDERMOTT RP, MIRAUS S, DIGNASS A, PODOLSKY DK. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 1996; **111**: 1706–1713.
- [116] RODELLA L, ZAMAI L, REZZANI R, ARTICO M, PERI G, FALCONI M, FACCHINI A, PELUSI G, VITALE M. Interleukin 2 and interleukin 15 differentially predispose natural killer cells to apoptosis mediated by endothelial and tumour cells. *Br J Haematol* 2001; **115**: 442–450.
- [117] RUCKERT R, BRANDT K, BULANOVA E, MIRGHOMIZADEH F, PAUS R, BULFONE-PAUS S. Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 3493–3503.
- [118] SCHLUNS KS, KLONOWSKI KD, LEFRANCOIS L. Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15/alpha+ bone marrow-derived cells. *Blood* 2004; **103**: 988–994.
- [119] SCHLUNS KS, WILLIAMS K, MA A, ZHENG XX, LEFRANCOIS L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2002; **168**: 4827–4831.
- [120] SEDER RA. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the *in vitro* priming of naive CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4. *J Immunol* 1996; **156**: 2413–2422.
- [121] SKOV S, BONYHADI M, ODUM N, LEDBETTER JA. IL-2 and IL-15 regulate CD154 expression on activated CD4 T cells. *J Immunol* 2000; **164**: 3500–3505.
- [122] STRENGELL M, MATIKAINEN S, SIREN J, LEHTONEN A, FOSTER D, JULKUNEN I, SARENEVA T. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* 2003; **170**: 5464–5469.
- [123] STRENGELL M, SARENEVA T, FOSTER D, JULKUNEN I, MATIKAINEN S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J Immunol* 2002; **169**: 3600–3605.
- [124] TAGAYA Y, BURTON JD, MIYAMOTO Y, WALDMANN TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *Embo J* 1996; **15**: 4928–4939.



- [125] TAGAYA Y, KURYS G, THIES TA, LOSI JM, AZIMI N, HANOVER JA, BAMFORD RN, WALDMANN TA. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14444–14449.
- [126] TAN JT, ERNST B, KIEPER WC, LEROY E, SPRENT J, SURH CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8<sup>+</sup> cells but are not required for memory phenotype CD4<sup>+</sup> cells. *J Exp Med* 2002; **195**: 1523–1532.
- [127] TOURKOVA IL, YURKOVETSKY ZR, GAMBOTTO A, MAKARENKOVA VP, PEREZ L, BALKIR L, ROBBINS PD, SHURIN MR, SHURIN GV. Increased function and survival of IL-15-transduced human dendritic cells are mediated by up-regulation of IL-15Ralpha and Bcl-2. *J Leukoc Biol* 2002; **72**: 1037–1045.
- [128] TRENTIN L, ZAMBELLO R, FACCO M, SANCETTA R, AGOSTINI C, SEMENZATO G. Interleukin-15: a novel cytokine with regulatory properties on normal and neoplastic B lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 1997; **27**: 35–42.
- [129] VAZQUEZ N, WALSH TJ, FRIEDMAN D, CHANOCK SJ, LYMAN CA. Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect Immun* 1998; **66**: 145–150.
- [130] VOSS SD, DALEY J, RITZ J, ROBERTSON MJ. Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J Immunol* 1998; **160**: 1618–1626.
- [131] WALDMANN TA, DUBOIS S, TAGAYA Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001; **14**: 105–110.
- [132] WALDMANN TA, TAGAYA Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 19–49.
- [133] WARREN HS, KINNEAR BF, KASTELEIN RL, LANIER LL. Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *J Immunol* 1996; **156**: 3254–3259.
- [134] WENG NP, LIU K, CATALFAMO M, LI Y, HENKART PA. IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. *Ann NY Acad Sci* 2002; **975**: 46–56.
- [135] WILKINSON PC, LIEW FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med* 1995; **181**: 1255–1259.
- [136] WU TS, LEE JM, LAI YG, HSU JC, TSAI CY, LEE YH, LIAO NS. Reduced expression of Bcl-2 in CD8<sup>+</sup> T cells deficient in the IL-15 receptor alpha-chain. *J Immunol* 2002; **168**: 705–712.
- [137] YAJIMA T, NISHIMURA H, ISHIMITSU R, WATASE T, BUSCH DH, PAMER EG, KUWANO H, YOSHIKAI Y. Overexpression of IL-15 *in vivo* increases antigen-driven memory CD8<sup>+</sup> T cells following a microbe exposure. *J Immunol* 2002; **168**: 1198–1203.
- [138] YAJIMA T, NISHIMURA H, SAD S, SHEN H, KUWANO H, YOSHIKAI Y. A novel role of IL-15 in early activation of memory CD8<sup>+</sup> CTL after reinfection. *J Immunol* 2005; **174**: 3590–3597.
- [139] YANG L, THORNTON S, GROM AA. Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 3010–3014.
- [140] YU H, FEHNIGER TA, FUCHSHUBER P, THIEL KS, VIVIER E, CARSON WE, CALIGIURI MA. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 1998; **92**: 3647–3657.
- [141] ZHANG J, SUN R, WEI H, TIAN Z. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Haematologica* 2004; **89**: 338–347.
- [142] ZHANG X, SUN S, HWANG I, TOUGH DF, SPRENT J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo* by IL-15. *Immunity* 1998; **8**: 591–599.
- [143] ZYGMUNT M, HAHN D, KIESENBAUER N, MUNSTEDT K, LANG U. Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 *in vitro*. *Am J Reprod Immunol* 1998; **40**: 326–331.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 20.02. 2006 r.

Przyjęto: 24.04.2006 r.

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

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





## ROLA INTERLEUKINY 15 W PATOGENEZIE ORAZ TERAPII CHOROÓB CZŁOWIEKA

### ROLE OF INTERLEUKIN 15 IN PATHOGENESIS AND THERAPY OF HUMAN DISEASES

Grzegorz Władysław BASAK<sup>1,2</sup>, Witold LASEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury oraz <sup>2</sup>Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Warszawie

*Streszczenie:* Interleukina 15 (IL-15) jest cytokiną o silnym działaniu na układ odpornościowy, wpływającą na patogenezę wielu chorób człowieka. W warunkach naturalnych uczestniczy w obronie przeciwvirusowej, w tym w zakażeniu wirusem HIV. IL-15 odgrywa także istotną rolę w wielu procesach autoimmunizacyjnych, zwłaszcza w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. Potencjalne strategie terapeutyczne mogą zmierzać w kierunku zahamowania jej funkcji. Podobnie, aktywność IL-15 może wpływać na proces odrzucania przeszczepów narządowych. W przypadku przeszczepiania komórek macierzystych, z jednej strony może odpowiadać za reakcję przeszczep przeciwko gospodarzowi, z drugiej strony jednak może nasilać reakcję przeszczep przeciwko nowotworowi oraz przyspieszać odnowę parametrów układu odpornościowego. W reakcjach alergicznych, IL-15 może wprawdzie hamować ostre reakcje, jednak z drugiej strony może nasilać reakcje przewlekłe. W artykule omówiono wyniki dotychczasowych badań nad rolą IL-15 w procesach patologicznych oraz wynikające z nich możliwości działania terapeutycznego.

*Słowa kluczowe:* interleukina 15, HIV, reumatoidalne zapalenie stawów.

*Summary:* Interleukin 15 (IL-15) is a cytokine with strong impact on immunological system, that affects pathogenesis of multiple human disorders. Naturally, it participates in antiviral defence. Infected peripheral blood mononuclear cells secrete IL-15 which, *via* its impact on NK cells and T lymphocytes, exerts antiviral properties. IL-15 may find its application in HIV infection treatment. Stimulating proliferation of antigen-activated T cells and inhibiting their apoptosis, IL-15 may counteract AIDS-associated lymphocytopenia. It may directly and indirectly influence anti-HIV reactions: enhancing CD8<sup>+</sup> T cell and NK cell responses as well as increasing secretion of chemokines, which act competitively with HIV molecules. However, there are several concerns regarding IL-15 as factor stimulating HIV replication. IL-15 plays an important role in many autoimmune processes. In rheumatoid arthritis, IL-15 is extensively secreted by synoviocytes. It supports chemotaxis of inflammatory cells to affected joints and directly stimulates secretion of proinflammatory cytokines. Novel therapeutic strategies for rheumatoid arthritis may involve inhibition of IL-15 function. IL-15 seems to play an important role in the pathogenesis of other autoimmune disorders such as colitis ulcerosa, Crohn's disease, multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. Similarly, IL-15

may contribute to the process of solid organ transplant rejection and may constitute for a target of future immunosuppressive therapies. In case of stem cell transplantation, IL-15 may exacerbate graft-versus-host reaction, but also enhance graft-versus-tumour reaction and shorten time to renewal of immunological parameters. During allergic reactions, IL-15 seems to inhibit acute response, but also potentiates chronic reactions. The article describes results of former investigations on IL-15 functions in pathological processes and resulting possibilities of therapeutic approaches.

*Key words:* interleukin 15, HIV, rheumatoid arthritis.

*Wykaz skrótów:* **ADCC** (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał; **AICD** (*activation induced cell death*) – śmierć komórki indukowana jej aktywacją; **BMT** (*bone marrow transplantation*) – zabieg przeszczepienia szpiku kostnego; **CNAR** (*CD8<sup>+</sup> cell noncytotoxic anti-HIV response*) – zjawisko hamowania replikacji wirusa HIV przez limfocyty T CD8<sup>+</sup> bez zabijania zakażonej komórki; **CsA** – cyklosporyna A; **CU** (*colitis ulcerosa*) – wrzodziejące zapalenie jelita grubego; **DLE** (*discoid lupus erythematosus*) – skórna, krążkowa postać tocznia rumieniowatego; **EBV** – wirus Ebsteina-Barr; **ER** (*enterocolitis regionalis*) – choroba Leśniowskiego-Crohna; **FK-506** – takrolimus; **GM-CSF** – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytarno-makrofagalnych; **GvHD** (*graft versus host disease*) – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi; **GvT** (*graft versus tumour*) – reakcja przeszczep przeciwko nowotworowi; **HAART** (*highly active antiretroviral therapy*) – trójlewkowa terapia antyretrowirusowa stosowana w przypadku zakażenia wirusem HIV; **HHV** (*human herpes virus*) – ludzki herpeswirus; **HSV** (*herpes simplex virus*) – wirus opryszczki zwykłej; **IEL** (*intraepithelial lymphocytes*) – limfocyty śród nabłonkowe; **IFN- $\gamma$**  – interferon  $\gamma$ ; **IL** – interleukina; **NKT** (*natural killer T cell*) – komórka NKT; **PBMC** (*peripheral blood mononuclear cells*) – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej; **PBSCT** (*peripheral blood stem cell transplantation*) – zabieg przeszczepienia komórek macierzystych izolowanych z krwi obwodowej; **RZS** – reumatoidalne zapalenie stawów; **SCID** (*severe combined immunodeficiency*) – ciężki, złożony zespół upośledzenia odporności; **SLE** (*systemic lupus erythematosus*) – toczeń układowy rumieniowaty; **SM** (*sclerosis multiplex*) – stwardnienie rozsiane; **TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$ .

## WSTĘP

Interleukina 15 (IL-15) jest cytokiną zdolną do stymulacji i podtrzymywania wzrostu zależnych od IL-2 komórek linii limfocytarnej CTLL, przy braku IL-2 [19], z czym wiązało się jej odkrycie. W związku z tym wykazuje ona szereg właściwości wspólnych z IL-2, bowiem cytokiny te wykorzystują wspólny receptor IL-2/15R $\beta$ . Jednak IL-15 ma także swój unikalny receptor IL-15R $\alpha$ , co wpływa na jej liczne, odrębne funkcje. IL-15 oddziałuje zarówno na mechanizmy odporności swojej, jak i nieswojej. Jest uważana za podstawowy czynnik w procesach dojrzewania i aktywacji komórek NK [59], wzmacnia ich cytotoksyczność [21] i wydzielanie przez nie IFN- $\gamma$  [22]. IL-15 jest również istotnym czynnikiem w procesie różnicowania komórek NKT [80].

IL-15 uczestniczy w rozwoju optymalnej odpowiedzi nabytej, ze strony limfocytów T. W przeciwieństwie do IL-2, która indukuje proces śmierci aktywowanych limfocytów (AICD – *activation-induced cell death*), IL-15 hamuje to zjawisko [66]. IL-15 (lecz nie IL-2) odgrywa główną rolę w inicjacji proliferacji limfocytów T *in vivo* [57] i oddziałuje na nie chemotaktycznie [110]. IL-15 przyczynia się do tzw. homeostatycznej proliferacji [40] oraz wydłużenia czasu przeżycia limfocytów T pamięci CD8<sup>+</sup> [111], jak również wzmacnia ich funkcje efektorowe [108]. Będąc czynnikiem niezbędnym do



wczesnej aktywacji komórek dendrytycznych [81], IL-15 wzmaga także prezentację antygenów.

IL-15 w sposób wszechstronny wpływa na układ odpornościowy, co związane jest także z oddziaływaniem na pozostałe układy i narządy. Poniżej opisana została rola IL-15 w różnych stanach chorobowych.

## INFEKCJE WIRUSOWE

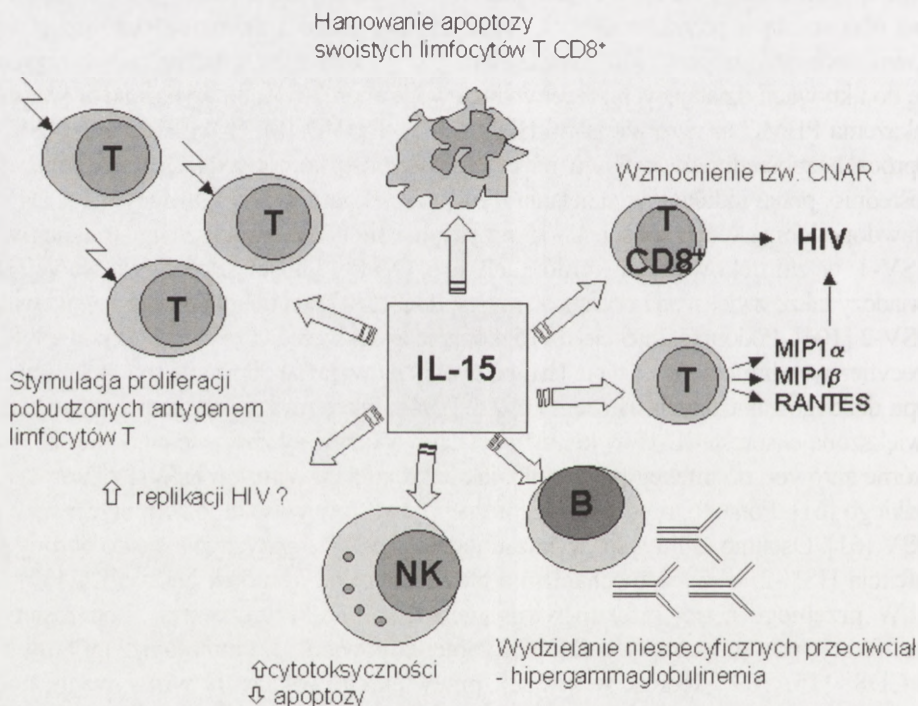
Wirusy są jednym z czynników indukujących wydzielanie IL-15 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC), które w przebiegu infekcji wirusowej jako pierwsze wydzielają tę cytokinę [32]. Związane jest to z obecnością w promotorze genu dla IL-15 tzw. obszaru indukowalnego przez wirusy („*virus-inducible region*”) [10]. Wydzielana przez PBMC IL-15 bezpośrednio przyczynia się do aktywacji działających przeciwwirusowo komórek NK, co wykazano w warunkach zakażenia PBMC *in vitro* wirusami HHV-6 [35], HHV-7 [8], HSV, EBV oraz RSV [32]. Oprócz bezpośredniego wpływu na cytotoksyczność komórek NK, IL-15 działa także pośrednio, przez indukcję wydzielania IFN- $\gamma$  przez komórki NK i limfocyty T CD4<sup>+</sup> [42]. Prawdopodobnie w ten sposób IL-15 przyczynia się także do obniżenia replikacji wirusa HSV-1 w zainfekowanych komórkach [4]. O aktywności przeciwwirusowej IL-15 świadczy także zwiększona podatność myszy IL-2/15R $\beta$ <sup>+</sup> na uogólnione zakażenie wirusem HSV-2 [104]. Podobnie, iniekcje IL-15, poprzez zwiększenie liczebności komórek NK oraz specyficznych limfocytów T typu Th1, pozwoliły na wyraźne obniżenie śmiertelności myszy typu dzikiego zakażonych wirusem HSV-2 [104]. Także myszy transgeniczne, wykazujące zwiększoną ekspresję IL-15 w keratynocytach, wykazywały znacznie łagodniejsze zmiany skórne zarówno po infekcji pierwotnej, jak też reinfekcji wirusem HSV-1 niż myszy typu dzikiego [61]. Ponadto, myszy transgeniczne wytwarzały wysoki poziom przeciwciał anti-HSV [61]. Ostatnio Gill i wsp. wykazali jednak, że IL-15 przyczynia się do obrony przed infekcją HSV-2, także w mechanizmie niezależnym od komórek NK i NKT [37].

W przebiegu ostrej infekcji wirusowej, IL-15 podtrzymuje tzw. homeostatyczną proliferację powstałych w wyniku pierwotnej odpowiedzi immunologicznej limfocytów T CD8<sup>+</sup> [15, 109]. Jednak w sytuacji przewlekłego zakażenia wirusowego, homeostatyczna proliferacja limfocytów pamięci T CD8<sup>+</sup> wydaje się nie zależeć od IL-15 [76]. Przepuszczalnie, IL-15 może pełnić w organizmie także zadanie profilaktyczne. Wykazano na modelu mysim, że w przebiegu indukowanego wirusem HSV zapalenia rogówki jednego oka, w oku drugim syntetyzowana jest IL-15. Co interesujące, dochodzi do tego już w chwili, gdy wirus pojawia się w zwoju nerwu trójdzielnego, a więc potencjalnie mógłby zainfekować drugie oko [24]. Przepuszczalnie, mechanizmy obronne związane z wydzielaniem IL-15 mogą także przyczyniać się do wystąpienia objawów chorobowych. Jako przykład może służyć mielopatia związana z ludzkim wirusem T-limfotropowym typu I/tropikalna spastyczna parapareza (HAM/TSP). W chorobie tej dochodzi do reakcji zapalnej w ośrodkowym układzie nerwowym, związanej z wysoką liczebnością limfocytów T CD8<sup>+</sup> w konsekwencji zakażenia wirusem

HTLV-1. Najprawdopodobniej wirus ten bezpośrednio stymuluje wydzielanie IL-15 przez zainfekowane limfocyty T, która w sposób auto- i parakrylny nasila ich proliferację [9].

IL-15 może znaleźć zastosowanie jako adiuwant szczepionek przeciwwirusowych. Udowodniono m.in., że nasila ona skuteczność szczepienia przeciwko wirusowi grypy w modelu mysim [55]. Podobnie, zaobserwowano, że donosowe podanie plazmidu kodującego IL-15, łącznie z plazmidem kodującym antygen wirusa HSV wywołuje znaczne nasilenie odpowiedzi pierwotnej i wtórnej ze strony limfocytów T  $CD8^+$  oraz odpowiedzi humoralnej [103].

IL-15 jest czynnikiem istotnie wpływającym na przebieg zakażenia wirusem HIV, bierze się ją pod uwagę także w próbach immunoterapii tej infekcji. Początkowo zaobserwowano, że IL-15 nasila proliferację pobudzonych antygenem limfocytów T izolowanych od pacjentów  $HIV^+$ . Sugerowano więc możliwość przeciwdziałania



RYCINA 1. Właściwości IL-15, istotne dla przebiegu zakażenia wirusem HIV. IL-15 stymuluje proliferację pobudzonych antygenem limfocytów T, co może przyczyniać się do nasilenia odporności przeciwko różnym patogenom, w tym również HIV. Poprzez hamowanie apoptozy swoistych przeciwwirusowo limfocytów T  $CD8^+$ , z jednej strony IL-15 zapobiega limfopenii i nasila odpowiedź przeciwko HIV, z drugiej strony jednak umożliwia przetrwanie wirusa w zakażonych limfocytach. Może nasilać odpowiedź typu CNAR ( $CD8^+$  cell noncytotoxic anti-HIV response), dzięki której limfocyty te hamują proliferację wirusa. Zwiększona pod wpływem IL-15 synteza chemokin hamuje rozprzestrzenianie się wirusa przez zablokowanie wspólnych receptorów. Poprzez stymulację limfocytów B, IL-15 może nasilać niespecyficzną hipergammaglobulinemię w przebiegu infekcji. Duże nadzieje wiąże się z aktywacją działających przeciwwirusowo komórek NK. Istnieje jednak prawdopodobieństwo, że IL-15 może nasilać replikację wirusa



limfopenii towarzyszącej infekcji HIV za pomocą IL-15 [96]. Limfocyty T CD8<sup>+</sup>, odgrywające podstawową rolę w odpowiedzi przeciwko wirusowi HIV, bardzo łatwo podlegają apoptozie. Wykazano natomiast, że IL-15 hamuje zarówno spontaniczną, jak też indukowaną przez CD95/Fas apoptozę specyficznych w stosunku do wirusa HIV limfocytów pamięci CD8<sup>+</sup>. Aktywuje te komórki, wzmacnia ich właściwości cytotoksyczne jak również nasila wydzielanie IFN- $\gamma$  [72]. Ostatnio odkryto właściwość limfocytów CD8<sup>+</sup>, dzięki której mogą one hamować replikację wirusa bez zabijania zakażonej komórki – zjawisko to nazwano CNAR (*CD8<sup>+</sup> cell noncytotoxic anti-HIV response*). Wykazano, że przyczyną CNAR jest wydzielanie IL-15 przez DC. Podobnie, podanie IL-15 powoduje wzmocnienie efektu CNAR [23]. IL-15 może także przyczyniać się do kontroli infekcji wirusem HIV poprzez indukcję wydzielania chemokin MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i RANTES przez limfocyty T pacjentów HIV<sup>+</sup>. Chemokiny te mogą bowiem kompetycyjnie blokować receptory, z którymi wiąże się wirus [36] (ryc. 1).

W zaawansowanym stadium infekcji wirusem HIV dochodzi do niedoboru lub braku limfocytów pomocniczych CD4<sup>+</sup>, podobnie jak wydzielanej przez nie IL-2. Natomiast wciąż można wykryć limfocyty cytotoksyczne, aktywne w stosunku do wirusa. Prawdopodobnie przyczynia się do tego zachodząca w opisanym stadium choroby oligoklonalna proliferacja limfocytów CD8<sup>+</sup> w narządach obwodowych, m.in. w płucach. Zasugerowano model, według którego IL-15, wydzielana przez makrofagi znajdujące się w tych narządach, wpływa na utrzymanie populacji limfocytów cytotoksycznych w stosunku do wirusa HIV oraz na ich aktywację [2]. Jednak w ten sposób IL-15 może bezpośrednio przyczyniać się także do wystąpienia przewlekłego zakażenia wirusem HIV. Wykazano, że podczas ostrej infekcji retrowirusowej limfocyty T CD8<sup>+</sup> mające koreceptor CCR5, a więc potencjalnie zakażone, wykazują wysoką podatność na spontaniczną apoptozę, ale także zwiększoną ekspresję mRNA dla IL-15R $\alpha$ . Z drugiej strony, pod wpływem IL-15 dochodzi do zahamowania w nich aktywności kaspaz, wzrasta poziom białka Bcl-2, a limfocyty zaczynają intensywnie proliferować. Zasugerowano, że limfocyty zakażone podczas pierwotnej infekcji mogą przemieszczać się do tkanek, gdzie w obecności IL-15 mogłyby przeżyć, a nawet proliferować, stanowiąc rezerwuar wirusa [114]. Istnieją dowody, że obwodowa produkcja IL-15 przez zakażone wirusem HIV makrofagi może bezpośrednio wpływać na populację limfocytów T zakażonych pacjentów. W przeciwieństwie do makrofagów izolowanych z pęcherzyków płucnych osób zdrowych, makrofagi izolowane od osób HIV<sup>+</sup> stale wydzielają IL-15 i IFN- $\gamma$  oraz wykazują ekspresję wszystkich łańcuchów IL-15R jak też cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 [3]. Wydajnie stymulują one proliferację limfocytów bezpośrednio zależną od IL-15 oraz od ekspresji cząsteczek kostymulujących przez makrofagi.

Komórki NK pacjentów HIV<sup>+</sup> wykazują znacznie obniżoną aktywność cytotoksyczną. Jednak stymulacja tych komórek za pomocą IL-15, poprzez wzrost ekspresji czynnika TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) w tych komórkach, pozwala znacznie zwiększyć ich cytotoksyczność w stosunku do komórek zakażonych wirusem HIV [63]. IL-15 może także zwiększać zdolność do cytotoksyczności zależnej od przeciwićciał (ADCC) komórek jednojądrzastych pocho-

dających od pacjentów HIV<sup>+</sup> [58], jak również hamować apoptozę izolowanych od pacjentów HIV<sup>+</sup> komórek NK [74]. Zaproponowano więc zastosowanie IL-15 u pacjentów HIV<sup>+</sup> w celu przywrócenia aktywności komórek NK.

Wraz z postępem infekcji HIV, w surowicy pacjentów wzrasta poziom IL-15, najprawdopodobniej wydzielanej przez monocyty/makrofagi [47]. Zauważono także wyraźny związek podwyższonego stężenia IL-15 ze wzrostem poziomu przeciwciał klasy IgG. Zaproponowano więc, że IL-15 mogłaby wpływać na występowanie częstej u pacjentów HIV<sup>+</sup> hipergammaglobulinemii [47]. Przepuszczalnie, w późnym stadium choroby, IL-15 może wpływać na poliklonalną aktywację i proliferację limfocytów B, jak też na wydzielanie niespecyficznych przeciwciał [46]. Dzięki temu, IL-15 może przyczynić się do upośledzenia odpowiedzi humoralnej u pacjentów z AIDS. Zaobserwowano wręcz, że w tych warunkach, IL-15 zapobiega aktywacji i wydzielaniu specyficznych przeciwciał przez aktywowane antygenem limfocyty B [39].

Pacjenci HIV<sup>+</sup> nie mają w pełni funkcjonalnych granulocytów. Wykazano, że IL-15 może bezpośrednio zwiększać ich żywotność, jak również zdolność do chemotaksji oraz aktywność przeciwrzybiczą zarówno u pacjentów nieleczonych, otrzymujących HAART, jak też opornych na tę terapię [67].

Przepuszczalnie, IL-15 może wpływać pozytywnie na wyniki leczenia antyretrowirusowego. Monocyty pochodzące od pacjentów wykazujących korzystną reakcję na HAART wydzielają znacznie więcej IL-15, a pochodzące od pacjentów opornych na HAART znacznie mniej IL-15, w porównaniu z osobami zdrowymi [30, 36]. Przepuszczalnie u pacjentów z korzystną reakcją, IL-15 może odgrywać rolę w procesie odnowy liczebności populacji limfocytów. Jednocześnie wykazano, że IL-15 może przywracać zdolność do prawidłowego wydzielania IFN- $\gamma$  przez limfocyty T pacjentów nieleczonych lub opornych na HAART [36].

Podjęto próby wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej w stosunku do wirusa HIV przy pomocy IL-15. Podawano myszom szczepionki DNA kodujące antygeny gp120 [112] bądź też gp160 [78] wirusa HIV łącznie z plazmidem kodującym IL-15. Uzyskano silną, długotrwałą odpowiedź ze strony specyficznych limfocytów T CD8<sup>+</sup> oraz produkcję specyficznych przeciwciał. Ponadto, IL-15 nie tylko w znacznym stopniu nasila proliferację i aktywuje specyficzne limfocyty T CD8<sup>+</sup>, wydłuża odpowiedź z ich strony, ale przede wszystkim jest zdolna do tego działania nawet przy wybitnie obniżonej liczebności limfocytów CD4<sup>+</sup>, co jest zjawiskiem leżącym u podstaw AIDS [55]. IL-15 może więc w przyszłości odegrać ważną rolę w strategii szczepienia przeciwko HIV.

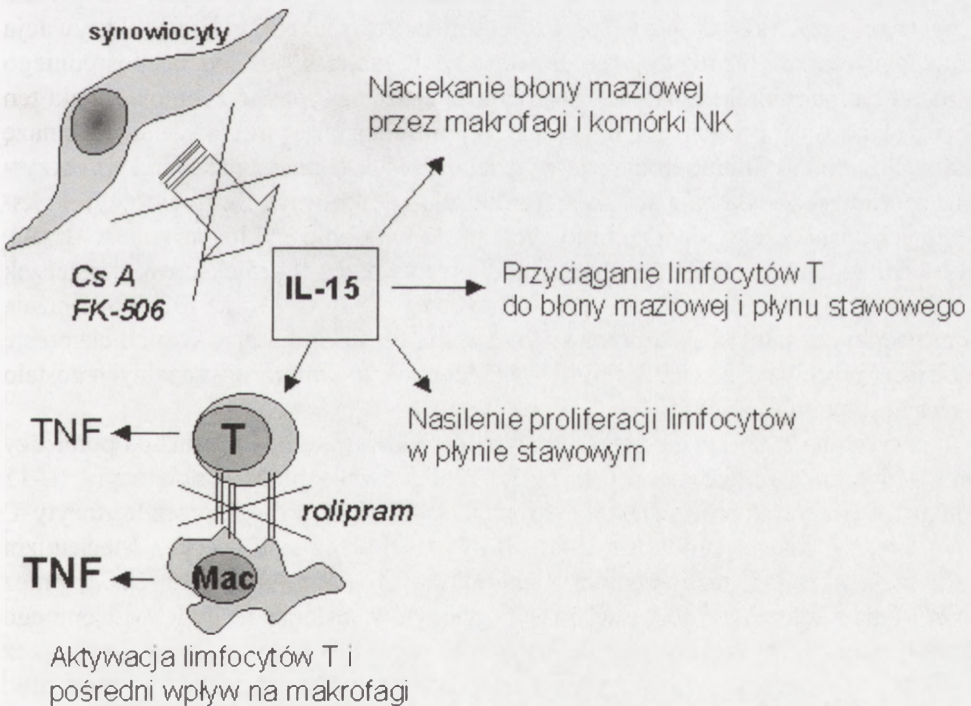
Zastosowanie IL-15 w terapii zakażenia wirusem HIV budzi jednak pewne obawy, ze względu na obserwowane w niektórych badaniach nasilenie replikacji wirusa. IL-15 może powodować nawet 100-krotny wzrost replikacji wirusa HIV *in vitro* [14]. Wydaje się jednak, że efekt ten zależy od stanu aktywacji zainfekowanych leukocytów i w związku z tym działanie IL-15 może różnić się w zależności od fazy choroby [14]. Inne badania wykazały natomiast, że wzrost replikacji wirusa nie zależy ani od proliferacji zainfekowanych komórek, ani wydzielania wtórnych cytokin [5]. Zaproponowano, że w przebiegu infekcji, białko Nef wirusa HIV stymuluje wydzielanie endogennej IL-15 przez zainfekowane makrofagi, która z kolei zarówno



nasila replikację wirusa HIV, jak też proliferację niezakażonych leukocytów [88]. Część nowszych badań nie potwierdziła jednak wpływu IL-15 na replikację wirusa HIV [30].

## CHOROBY AUTOIMMUNIZACYJNE

mRNA kodujące IL-15 występuje powszechnie w różnych komórkach i tkankach naszego organizmu. Jednak tylko niektóre komórki wydzielają IL-15. Ekspresja IL-15 jest bowiem bardzo ściśle kontrolowana, nie tylko na etapie transkrypcji, ale przede wszystkim na etapie translacji oraz wydzielania cząsteczek białka. Ponadto, wiązanie wydzielanej IL-15 z receptorem o wysokim powinowactwie IL-15R $\alpha$  pozwala na szybkie usunięcie jej z organizmu oraz na ewentualne ujawnianie w formie związanej z receptorem. W ten sposób organizm zabezpiecza się przed działaniem czynnika, który potencjalnie mógłby okazać się dla niego niebezpieczny. Wysoka reaktywność immunologiczna IL-15 sprawia, że mechanizmy regulujące jej ekspresję wydają się



RYCINA 2. W reumatoidalnym zapaleniu stawów, w objętych procesem zapalnym stawach IL-15 jest produkowana głównie przez synowiocyty. Zarówno cyklosporyna A (CsA), jak i takrolimus (FK-506) hamują ten proces. IL-15 wpływa na naciekanie błony maziowej przez makrofagi, komórki NK oraz, przede wszystkim, limfocyty T. Pod jej wpływem, limfocyty T proliferują w płynie maziowym oraz są aktywowane. IL-15 nasila syntezę czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) również przez limfocyty, ale w głównej mierze przez pobudzone przez nie makrofagi. Rolipram poprzez blokowanie interakcji limfocytów i makrofagów hamuje syntezę TNF- $\alpha$

niezbędne, aby nie doszło do patologicznego, nadmiernego pobudzenia komórek układu odpornościowego, także tych autoreaktywnych. Zaburzenia ekspresji IL-15 mogą wywoływać m.in. choroby z autoagresji. Według ostatnich doniesień, IL-15 może być jednym z głównych czynników przyczyniających się do przełamania tolerancji obwodowej autoreaktywnych limfocytów T [64]. Wykazano związek IL-15 z patogenezą szeregu chorób autoimmunizacyjnych.

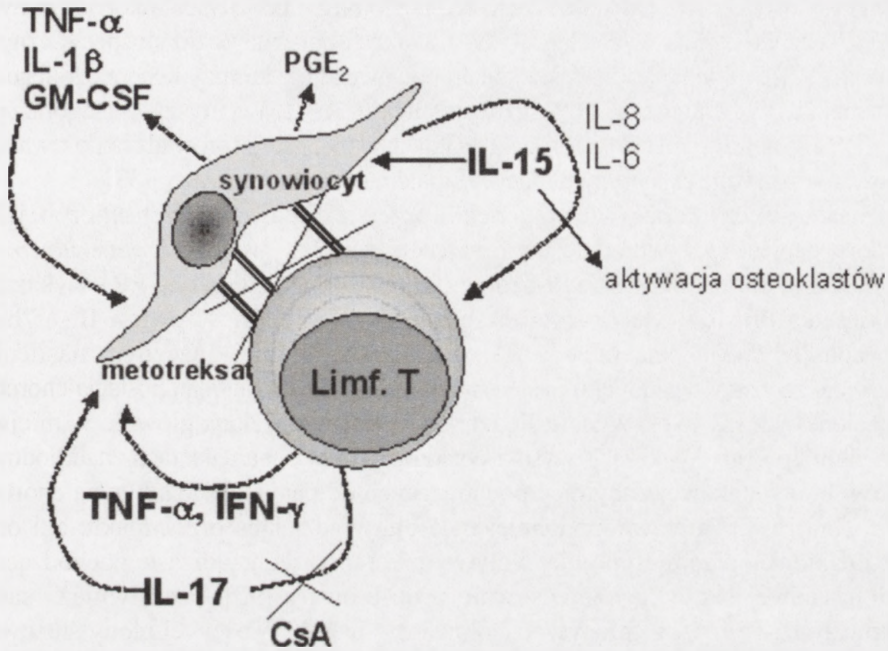
W płynie stawowym pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) odnotowano wysokie stężenie IL-15 [68]. Za jej produkcję najprawdopodobniej odpowiedzialne są synowioocyty [43]. Wydaje się, że IL-15 może przyciągać komórki nacieku zapalnego, głównie limfocyty T, do błony maziowej i aktywować je – dostawowe podanie IL-15 wywoływało w modelu mysim lokalną reakcję zapalną z naciekiem limfocytów T [68]. Limfocyty izolowane z płynu stawowego dynamicznie proliferują pod wpływem IL-15 [68]. IL-15 wpływa także na naciekanie błony maziowej przez makrofagi i komórki NK [102] (ryc. 2).

Czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) jest uważany za jeden z głównych czynników przyczyniających się do patogenezы RZS. Wykazano, że TNF- $\alpha$  jest wydzielany przez pobudzone w wyniku działania IL-15 limfocyty, ale przede wszystkim przez aktywowane przez te limfocyty makrofagi [69]. Aktywacja makrofagów przez limfocyty stymulowane IL-15 zależna jest od bezpośredniego kontaktu tych komórek, w którym pośredniczą cząsteczki powierzchniowe. Fakt ten może zostać wykorzystany w terapii. Leki immunosupresyjne aktywujące kinazę białkową A, m.in. rolipram, obniżają wydzielanie TNF- $\alpha$  przez makrofagi wykorzystując to zjawisko – hamują wywołaną przez IL-15 aktywację limfocytów T i ekspresję ich cząsteczek powierzchniowych [48]. Podobnie cyklosporyna A (CsA), stosowana w leczeniu RZS, zapobiega indukowanej przez IL-15 ekspresji cząsteczek CD69 na powierzchni limfocytów płynu stawowego [83]. CsA oraz FK-506 obniżają także produkcję samej IL-15 przez synowioocyty, często indukując w nich ekspresję działającej przeciwzapalnie IL-10 [26] (zagadnienie cytokin przeciwzapalnych zostało obszernie omówione w [51a]).

U chorych na RZS istnieje pętla wzajemnego oddziaływania i stymulacji pomiędzy synowiocytami a limfocytami T (ryc. 3). Produkowana przez synowioocyty IL-15 indukuje wydzielanie prozapalnych cytokin: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-17 przez limfocyty T. Z kolei one wzmagają produkcję IL-15, IL-8 i IL-6 przez synowioocyty. Mechanizm ten zależy także od bezpośredniego kontaktu tych komórek. Metotreksat, przez zmniejszenie adhezji limfocytów do synowioocytów, osłabia tę pętlę wzajemnego oddziaływania [71]. Szczególną rolę przypisuje się indukcji wydzielania IL-17 przez IL-15. IL-17 stymuluje synowioocyty do produkcji licznych prozapalnych czynników: IL-6, IL-8, GM-CSF i PGE<sub>2</sub> [115]. Natomiast CsA hamuje indukowane przez IL-15 wydzielanie IL-17 [115]. Wykazano też, że IL-15 przyczynia się do zwiększenia ekspresji cyklooksygenazy typu II (COX-2) w synowioocytach zarówno bezpośrednio, jak też przez wzmoczenie produkcji TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  [70], co również może przyczyniać się do nasilenia procesu zapalnego.

W przebiegu RZS dochodzi do patologicznego rozrostu synowioocytów, najprawdopodobniej związanego z oddziaływaniem IL-15. Wykazano, że synowioocyty mają w





RYCINA 3. Interakcje pomiędzy synowiocytami a limfocytami T w stawach pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Produkowana przez synowioocyty IL-15 stymuluje limfocyty T do produkcji cytokin prozapalnych, które z kolei wpływają na liczne funkcje synowiocytów, m.in. zwrotnie stymulują je do produkcji IL-15, ale także innych czynników bezpośrednio przyczyniających się do patogenezы RZS. Jednocześnie, IL-15 w sposób autokrywny oddziałuje na synowioocyty stymulując ich podziały, hamując apoptozę i aktywując te komórki. Leki immunosupresyjne mogą osłabiać tę interakcję – metotreksat przez hamowanie adhezji limfocytów do synowiocytów, natomiast CsA poprzez zahamowanie syntezy IL-17

pełni funkcjonalny receptor IL-15R $\alpha\beta\gamma$ , a jego zablokowanie może osłabiać tempo proliferacji komórek, obniżać poziom antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-xL, a następnie wywoływać samą apoptozę [53]. W związku z tym wydaje się, że IL-15 jest autokrywnym czynnikiem aktywującym te komórki, prowadzącym do ich podziałów i zapobiegającym apoptozie. IL-15 może także przyczyniać się do niszczenia stawów przez stymulację rozwoju osteoklastów [77]. Zaproponowano też model, w którym IL-15 przyczynia się do neowaskularyzacji błony maziowej zwiększając możliwość migracji limfocytów do objętego procesem zapalnym stawu. Komórki śródbłonna naczyniowego wykazują bowiem ekspresję IL-15R, a IL-15 działa na nie antyapoptotycznie [113].

Stężenie IL-15 w surowicy pacjentów z RZS jest istotnie wyższe niż u osób zdrowych [29], szczególnie u pacjentów o długim okresie trwania choroby [41]. Co ciekawe, stężenie to nie zależy od aktywności procesu chorobowego i nie ulega obniżeniu nawet po sterydoterapii [29].

Podjęmowane są próby terapii hamującej aktywność IL-15. Wykazano na mysim modelu RZS, że podawanie wolnego receptora IL-15R $\alpha$  w znacznym stopniu

spowalnia rozwój choroby. Dochodzi także do spowolnienia proliferacji autoreaktywnych splenocytów, zmniejszenia wydzielania IFN- $\gamma$ , a także obniżenia poziomu specyficznych przeciwciał [92]. Podobnie korzystnie działało podawanie białka fuzyjnego złożonego ze zmutowanej IL-15 i fragmentu Fc $\gamma$ 2a przeciwciała (CRB-15) u myszy. Antagonizując funkcje IL-15R, terapia ta działała zarówno profilaktycznie, jak też prowadziła do trwałego zahamowania rozwoju eksperymentalnego zapalenia stawów u myszy [33].

IL-15 uczestniczy także w patogenezie przewlekłych zapalnych chorób jelit. Zarówno u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (*colitis ulcerosa*, CU), jak z chorobą Leśniowskiego-Crohna (*enterocolitis regionalis*, ER) wykazano wzrost odsetka PBMC wykazujących ekspresję IL-15 [51]. W surowicy, IL-15 była wykrywana jedynie u pacjentów z CU o umiarkowanym i znacznym nasileniu, natomiast nie zaobserwowano jej u pacjentów w remisji oraz z łagodną postacią choroby, ani u pacjentów z ER [51]. Wydaje się, że IL-15 jest wydzielana głównie w miejscu procesu chorobowego. Wykazano wysoki poziom IL-15 w supernatantach z nad hodowli skrawków błony śluzowej odbytnicy pochodzących od pacjentów z aktywną chorobą zapalną jelita [95]. Najprawdopodobniej była ona wydzielana przez makrofagi oraz komórki nabłonka, natomiast pod jej wpływem, komórki jednojądrzaste pochodzące z blaszki właściwej skrawków intensywnie proliferowały [95], jak również same produkowały IL-15 [60]. Limfocyty T izolowane z blaszki właściwej błony śluzowej, zwłaszcza z ER, pod wpływem IL-15 wydzielały IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  pomimo braku stymulacji antygenowej [60]. Ponadto, w drodze interakcji cząsteczek CD40L i CD40 stymulowały monocyty do produkcji prozapalnych cytokin: TNF- $\alpha$  i IL-12, a interakcja ta była znacznie nasiloną w warunkach inkubacji z IL-15 [60]. Także myszy transgeniczne, które wykazywały wybiórczą wzmoczoną ekspresję IL-15 w komórkach nabłonka jelitowego, spontanicznie rozwijały proces zapalny dotyczący bliższego odcinka jelita cienkiego [79]. Stopień ciężkości choroby korelował z naciekiem blaszki właściwej jelita przez limfocyty oraz zwiększonym wydzielaniem przez nie TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Limfocyty te wykazywały wzmoczoną odporność na proces śmierci zależnej od aktywacji komórki (*activation-induced cell death* – AICD). Pojawiają się jednak sugestie, że nadekspresja IL-15 w chorobie Leśniowskiego-Crohna może być tylko przejawem reakcji obronnych przeciwko nadmiernej odpowiedzi ze strony limfocytów Th1 [99].

Nadekspresja IL-15 może przyczynić się także do patogenezy choroby trzewnej. IL-15 może indukować limfocyty śród nabłonkowe IEL CD94+, wydzielające intensywnie IFN- $\gamma$  i IL-10. Z kolei IL-10 nasila zabijanie enterocytów w drodze interakcji Fas-FasL [31].

IL-15 może odgrywać rolę w patogenezie stwardnienia rozsianego (*sclerosis multiplex* – SM). Częstość występowania PBMC wykazujących ekspresję IL-15 [85], jak też stężenie IL-15 w surowicy [62] jest znacznie wyższe u pacjentów z SM niż u osób zdrowych. Jednocześnie, liczba tych komórek koreluje z ciężkością i czasem trwania choroby [85]. Wykazano jednak, że u pacjentów z postacią nawrotową SM, poziom mRNA dla IL-15 w PBMC jest w fazie remisji podobny do tego u ludzi zdrowych, natomiast dochodzi do jego wzrostu w okresach nawrotów [16]. Wykazano negatywną korelację pomiędzy poziomem mRNA a długością



okresów remisji u pacjentów [16]. Podobnie, poziom IL-15 w surowicy koreluje ze stanem aktywności choroby w postaci nawracającej [62].

Stężenie IL-15 w surowicy pacjentów z toczniem układowym rumieniowatym (SLE) jest istotnie wyższe niż u osób zdrowych [84]. Dotyczy to jednak tylko ok. 38% pacjentów [7]. Stężenie IL-15 nie korelowało ze stanem pacjentów ani z parametrami laboratoryjnymi świadczącymi o ciężkości choroby [84]. IL-15 mogła być jednak odpowiedzialna za występowanie u pacjentów niektórych zjawisk immunologicznych, charakterystycznych dla SLE. Zauważono korelację występowania podwyższonego poziomu IL-15 oraz wzrostu ekspresji cząsteczek CD25 oraz stężenia białka antyapoptotycznego Bcl-2 w limfocytach [7]. W sprzeczności z powyższymi wynikami pozostają jednak nowsze badania na reprezentatywnej, licznej grupie pacjentów z SLE, z których wynika, że poziom IL-15 u pacjentów z SLE nie różni się istotnie od poziomu u zdrowych ludzi [90].

W toku przewlekłych chorób zapalnych tkanki łącznej, fibroblasty nabywają zdolności do pobudzenia proliferacji aktywowanych limfocytów T w drodze bezpośredniego kontaktu. Przymuszczalnie, odpowiedzialna za to może być IL-15, występująca na błonie komórkowej fibroblastów stymulowanych przez czynniki prozapalne, np. TNF- $\alpha$  [89]. Wykazano, że fibroblasty izolowane ze zmian skórnych w „krażkowej”, skórnej postaci tocznia rumieniowatego (*dyscoïd lupus erythematosus* – DLE), w przeciwieństwie do izolowanych ze zdrowej skóry, wykazują błonową ekspresję IL-15 [89]. Być może podobna sytuacja ma miejsce w zapaleniu skórnomięśniowym i wielomięśniowym, gdzie stymulowane mioblasty są pobudzane do produkcji m.in. IL-15 przez naciekające, autoreaktywne limfocyty w drodze interakcji cząsteczek CD40 i CD40L [101].

Keratynocyty izolowane ze zmian skórnych w łuszczycy, wykazywały wysoką ekspresję zarówno IL-15, jak i IL-15R w porównaniu z keratynocytami osób zdrowych. Wykazano też, że IL-15 wpływa hamująco na indukowaną wiązaniem FasL apoptozę tych keratynocytów [93]. W mysim modelu przeszczepu ksenogenicznego ludzkiej skóry ze zmianami łuszczycowymi, zastosowano działające antagonistycznie w stosunku do IL-15 przeciwciała. Spowodowało to zmniejszenie grubości naskórka, ograniczenie parakeratozy, liczby komórek nacieku zapalnego oraz liczby dzielących się keratynocytów [106].

Na modelu mysim cukrzycy insulinozależnej – u myszy NOD wykazano, że w okresie bezpośrednio poprzedzającym naciekanie wysp trzustki dochodzi w nich do ekspresji IL-15. Koreluje z nią również wzrost ekspresji IL-18 i IL-12 [91]. Wydzielanie IL-15 przez komórki wysp trzustki wydaje się zachodzić m.in. pod wpływem prozapalnych cytokin, w warunkach eksperymentalnych był to IFN- $\gamma$  [20]. Zastępowano, że IL-15 może być cytokiną odpowiedzialną za naciekanie i aktywację komórek jednojądrzastych, a w rezultacie niszczenie wysp. Jednak badania z zastosowaniem u myszy NOD białka fuzyjnego IL-15-IgG2b (IL-15 o przedłużonym czasie półtrwania) dostarczają przeciwstawnych wyników. Iniekcje spowodowały spadek częstości występowania cukrzycy u leczonych myszy, ale nie wpłynęły na proces zapalenia wysp trzustkowych [98]. Wiązano to przede wszystkim z zahamowaniem apoptozy komórek  $\beta$  wysp trzustkowych.

## ASTMA

IL-15, zwłaszcza poprzez wpływ na równowagę limfocytów Th1/Th2, może odgrywać pewną rolę w zjawiskach nadwrażliwości. Wykazano, że nadekspresja IL-15 *in vivo* przeciwdziała reakcjom alergicznym w drogach oddechowych. Odbywa się to dzięki hamowaniu odpowiedzi typu Th2 przez powstałe pod wpływem IL-15 limfocyty T CD8<sup>+</sup> [45]. Jednak istnieją również dane, według których IL-15 nasila procesy zachodzące w astmie oskrzelowej. Osoby cierpiące na umiarkowaną i ciężką postać astmy wykazują zwiększoną ekspresję IL-15 w warstwie podśluzowej drzewa oskrzelowego [44]. Sugerowany jest model, według którego IL-15 nasila objawy poprzez hamowanie apoptozy naciekających oskrzela granulocytów kwasochłonnych [44]. Przypuszczalnie istnieje także związek pomiędzy polimorfizmem genu dla IL-15 a występowaniem astmy i innych chorób atopowych [54]. Obniżona ekspresja IL-15 może przyczynić się też do podatności na atopowe zapalenie skóry (AZS). PBMC pacjentów z AZS wydzielają znacznie mniej IL-15, a ich monocyty wykazywały obniżoną ekspresję błonowej IL-15 [82]. Natomiast inkubacja PBMC z IL-15 powodowała znaczne obniżenie wydzielania IgE przez te komórki.

## TRANSPLANTOLOGIA

Zauważono, że odrzucaniu przeszczepu allogenicznego nerki towarzyszy wzrost ekspresji mRNA kodującego IL-15 w próbkach pobranych w biopsji [86]. Podobne zjawisko zaobserwowano w przebiegu odrzucania przeszczepu wysp trzustkowych w modelu zwierzęcym [65], przeszczepu serca [11] oraz odrzucaniu przeszczepów płuc u ludzi [97]. Udokumentowano zarówno wzrost poziomu IL-15 w surowicy, jak też jej ekspresji w odrzucanym przeszczepie wątroby, szczególnie w przebiegu ostrego odrzucania opornego na steroidy oraz w odrzucaniu przewlekłym [27]. Zastosowanie inhibitorów kalcyneuryny, jak też steroidów nie wpływało na wydzielanie IL-15 [27]. Inne badania natomiast nie wykazały korelacji ekspresji IL-15 z samym procesem odrzucania wątroby, a tym bardziej z jego stopniem zaawansowania [12]. Dopatrywano się nawet związku pomiędzy występowaniem podwyższonego poziomu mRNA IL-15 w wątrobie, a zwiększoną akceptacją przeszczepu [28].

Ważną rolę IL-15 w procesie odrzucania przeszczepów potwierdził też eksperyment, w którym w mysim modelu transplantacji serca podawano antagonistę IL-15 – sIL-15R $\alpha$  [100]. Zastosowana terapia pozwoliła zapobiec odrzucaniu niezgodnych pod względem słabego antygeny zgodności tkankowej przeszczepów, choć wyniki nie były tak zachęcające przy całkowitej niezgodności pod względem MHC. Zastosowanie antagonisty IL-15 łącznie z pojedynczą dawką przeciwciał anti-CD4 pozwoliło jednak na znaczne wydłużenie czasu przeżycia przeszczepu w tym ostatnim przypadku. Podobne wyniki uzyskano po zastosowaniu fuzyjnego białka IL-15 mutant/Fc $\gamma$ 2a (antagonisty IL-15). Szczególnie silną tolerancję względem nie w pełni zgodnych z



gospodarzem przeszczepów wysp trzustkowych uzyskano stosując razem antagonistę IL-15 z białkiem fuzyjnym CTLA4/Fc (działającym tolerogennie – przeciwdziałając do sygnałów przewodzonych przez cząsteczki kostymulujące CD28) [34].

Wydaje się, że IL-15 może odgrywać rolę co najmniej w niektórych przypadkach odrzucania przeszczepów nerek u ludzi. Wykazano, że ludzkie komórki nabłonka kanalików nerkowych nabywały zdolności do wydzielania IL-15, wskutek interakcji z naciekającymi limfocytami. Czynnikiem zasadniczymi w tej interakcji były cząsteczki CD40L oraz IFN- $\gamma$  wydzielany przez te limfocyty [107]. Natomiast wydzielana IL-15 stymulowała proliferację limfocytów. Pomimo że stosowane konwencjonalnie środki immunosupresyjne – deksametazon i rapamycyna nie wywierały wpływu na syntezę IL-15 przez komórki kanalików nerkowych, efektywnie hamowały aktywność IL-15. W przeciwieństwie do nich, cyklosporyna nie hamowała tej aktywności. Zaproponowano, że zjawisko to może leżeć u podstawy mechanizmów oporności na cyklosporynę [56]. Jednocześnie zaproponowano, że IL-15, ze względu na jej właściwości antyapoptotyczne i prozapalne, może odgrywać rolę w patogenezie indukowanego przez cyklosporynę przerostu drąża [18].

Jedną z nowych strategii zapobiegania odrzucaniu przeszczepów allogenicznych nerek jest zastosowanie przeciwciała przeciwko cząsteczce CD25 (IL-2R $\alpha$ ) – basiliximabu. Udowodniono, że hamuje ono odpowiedź ze strony alloreaktywnych limfocytów nie tylko przez blokowanie sygnału przekazywanego przez IL-2, ale także przez IL-15, ponieważ obniża też poziom IL-2/15R $\beta$  [13].

Intensywnie badany jest udział IL-15 w przeszczepianiu szpiku (BMT) i komórek macierzystych krwi obwodowej (PBSCT). Jednym z ich powikłań jest niepełna odbudowa populacji limfocytów T po przeszczepieniu. Występują w obniżonej liczebności, są podatne na spontaniczną apoptozę oraz mają zaburzone liczne funkcje. Wykazano, że stymulowane *in vitro* za pomocą IL-15 nabywają oporności na apoptozę, jak też zdolności do proliferacji stymulowanej antygenem [94]. Przeprowadzone ostatnio badanie, z zastosowaniem IL-15 u myszy po allogenicznym przeszczepieniu szpiku opisuje jej wpływ na parametry immunologiczne po zabiegu [6]. Odnotowano wzrost liczebności pochodzących od dawcy limfocytów CD8<sup>+</sup>, komórek NK i NKT. IL-15 stymulowała homeostatyczną proliferację limfocytów CD8<sup>+</sup> dawcy, ich ekspresję Bcl-2 oraz liczbę proliferujących komórek CD8<sup>+</sup> i NK. Zmniejszyła także odsetek komórek apoptotycznych wśród komórek CD8<sup>+</sup>. Zaproponowano więc zastosowanie IL-15 w celu stymulacji upośledzonych po przeszczepieniu mechanizmów odporności.

Wykazano, że IL-15 osiągała maksymalne stężenie w surowicy pacjentów w przebiegu 15 dni po allogenicznym BMT, lecz powracało ono do poziomu podstawowego w ciągu 25 dni [52]. Jednak u pacjentów z ciężką postacią ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) (III lub IV stopień) podwyższony poziom IL-15 utrzymywał się znacznie dłużej [52]. Ponadto, maksymalny poziom stężenia IL-15 w surowicy był istotnie wyższy u pacjentów z ostrą GVHD [25]. Dlatego wydaje się, że IL-15 może wpływać na proces zapalny w ostrej GVHD. Ponadto, badania Blasera i wsp. wykazały, że wystąpienie GVHD w modelu mysim zależy bezpośrednio od ekspresji IL-15 przez komórki szpiku dawcy [17]. Wydzielanie IL-15 przez przeszczepione komórki szpiku powodowało wzrost liczebności populacji

alloreaktywnych limfocytów T CD8<sup>+</sup> pamięci pochodzących od dawcy, jak też ich aktywację. Zaproponowano, że produkowana cytokina była następnie wychwytywana przez IL-15R $\alpha$  na pochodzących od biorcy komórkach dendrytycznych, które w ten sposób ujawniały ją allogenicznym limfocytom T CD8<sup>+</sup>. Przepuszczalnie polimorfizm genu dla IL-15 i genów odpowiedzialnych za jej kontrolę ekspresji w komórkach dawcy mogą wpływać na jej wydzielanie po przeszczepieniu przyczyniając się do częstszego występowania ostrej GVHD w określonych przypadkach [17]. Z tego samego względu należy z ostrożnością podchodzić do prób stosowania IL-15 u biorców szpiku. Jednak wydaje się, że jeżeli przeszczep zostanie pozbawiony limfocytów T, podawanie IL-15 jest bezpieczne [6]. Alternatywnie, zablokowanie sygnału przekazywanego przez IL-15 mogłoby stanowić możliwość leczenia lub profilaktyki ostrej GVHD [17], jakkolwiek nie wiadomo, jak taka terapia mogłaby wpływać na reakcję przeszczep przeciwko nowotworowi (GVT). Wcześniejsze badania wykazały bowiem, że podawanie IL-15 po BMT w modelu mysim, zarówno syngenicznym [49] jak i allogenicznym [6], może nasilać korzystną reakcję GVT.

## ZABURZENIA ODPORNOŚCI

Ciężki, złożony niedobór odporności (SCID) u ludzi wiąże się niekiedy z brakiem łańcucha  $\gamma$  lub biorącego udział w przekazywaniu sygnału z tego łańcucha białka JAK3 [75, 105]. Jest to związane z upośledzeniem przekazywania sygnałów z receptorów dla IL-15, ale także z receptorów dla IL-2, IL-7 i IL-9. Odnotowano również przypadek, kiedy SCID wynikał z braku ekspresji IL-2/15R $\beta$  [38]. U pacjenta zaobserwowano niedobór komórek NK, obniżoną liczbę limfocytów T oraz prawidłową liczbę limfocytów B. Wykazano u niego upośledzoną odporność komórkową i humoralną, czego skutkiem były ciężkie i nawracające infekcje wirusowe i grzybicze.

## PODSUMOWANIE

Zaburzenia ekspresji i nadmierna aktywność IL-15 w organizmie prowadzi zwykle do procesów patologicznych. Dlatego opracowywane są metody blokowania jej działania za pomocą przeciwciał monoklonalnych, rozpuszczalnych receptorów lub działających antagonisticznie białek fuzyjnych. Opublikowane ostatnio wyniki badania fazy I/II z zastosowaniem ludzkich przeciwciał anti-IL-15 (HuMax-IL15) u pacjentów z RZS [13a] sugerują, że terapia skierowana przeciwko IL-15 może w najbliższej przyszłości stać się integralną częścią schematów leczenia tej choroby. Jednak w przypadku niektórych chorób bądź działań terapeutycznych uzasadnione może być również podawanie IL-15.



## PIŚMIENNICTWO

- [1] AGOSTINI C, TRENTIN L, FACCO M, SANCETTA R, CERUTTI A, TASSINARI C, CIMAROSTO L, ADAMI F, CIPRIANI A, ZAMBELLO R, SAMENZATO G. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; **157**: 910–918.
- [2] AGOSTINI C, TRENTIN L, SANCETTA R, FACCO M, TASSINARI C, CERUTTI A, BORTOLIN M, MILANI A, SIVIERO M, ZAMBELLO R, SEMENZATO G. Interleukin-15 triggers activation and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 1997; **90**: 1115–1123.
- [3] AGOSTINI C, ZAMBELLO R, FACCO M, PERIN A, PIAZZA F, SIVIERO M, BASSO U, BORTOLIN M, TRENTIN L, SEMENZATO G. CD8 T-cell infiltration in extravascular tissues of patients with human immunodeficiency virus infection. Interleukin-15 upmodulates costimulatory pathways involved in the antigen-presenting cells-T-cell interaction. *Blood* 1999; **93**: 1277–1286.
- [4] AHMAD A, SHARIF-ASKARI E, FAWAZ L, MENEZES J. Innate immune response of the human host to exposure with herpes simplex virus type 1: *in vitro* control of the virus infection by enhanced natural killer activity via interleukin-15 induction. *J Virol* 2000; **74**: 7196–7203.
- [5] AL-HARTHI L, ROEBUCK KA, LANDAY A. Induction of HIV-1 replication by type 1-like cytokines, interleukin (IL)-12 and IL-15: effect on viral transcriptional activation, cellular proliferation, and endogenous cytokine production. *J Clin Immunol* 1998; **18**: 124–131.
- [6] ALPDOLGAN O, ENG JM, MURIGLAN SJ, WILLIS LM, HUBBARD VM, TJOE KH, TERWEY TH, KOCHMAN A, VAN DEN BRINK MR. Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2005; **105**: 865–873.
- [7] ARINGER M, STUMMVOLL GH, STEINER G, ARINGER M, STUMMVOLL GH, STEINER G, KOLLER M, STEINER CW, HOFLER E., HIESBERGER H, SMOLEN JS, GRANINGER WB. Serum interleukin-15 is elevated in systemic *lupus erythematosus*. *Rheumatology (Oxford)* 2001; **40**: 876–881.
- [8] ATEDZOE BN, AHMAD A, MENEZES J. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J Immunol* 1997; **159**: 4966–4972.
- [9] AZIMI N, MARINER J, JACOBSON S, WALDMANN TA. How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; **16**: 1717–1722.
- [10] AZIMI N, SHIRAMIZU KM, TAGAYA Y, MARINER J, WALDMANN TA. Viral activation of interleukin-15 (IL-15): characterization of a virus-inducible element in the IL-15 promoter region. *J Virol* 2000; **74**: 7338–7348.
- [11] BAAN CC, KNOOP CJ, HOLWEG CT, VAN GELDER T, METSELAAR HJ, NIESTERS HG, ZONDERVAN PE, BALK AH, WEIMAR W. The macrophage-derived T-cell growth factor interleukin-15 is present in interleukin-2-independent rejection after clinical heart and liver transplantation. *Transplant Proc* 1999; **31**: 2726–2728.
- [12] BAAN CC, NIESTERS HG, METSELAAR J, MOL WM, LOONEN EH, ZONDERVAN PE, TILANUS HW, JM IJ, SCHALM SW, WEIMAR W. Increased intra-graft IL-15 mRNA expression after liver transplantation. *Clin Transplant* 1998; **12**: 212–218.
- [13] BAAN CC, VAN RIEMSDIJK-OVERBEEKE IC, BOELAARS-VAN HAPEREN MJ, JM IJ, WEIMAR W. Inhibition of the IL-15 pathway in anti-CD25 mAb treated renal allograft recipients. *Transpl Immunol* 2002; **10**: 81–87.
- [13a] BASLUND B, TVEDE N, DANNESKIOLD-SAMSOE B, LARSSON P, PANAYI G, PETERSEN J, PETERSEN LJ, BEURSKENS FJ, SCHUURMAN J, VAN DE WINKEL JG, PARREN PW, GRACIE JA, JONGBLOED S, LIEW FY, MCINNES IB. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 2686–2692.
- [14] BAYARD-MCNEELEY MH, DOO MH, HE S, HAFNER A, JOHNSON WD JR, HO JL. Differential effects of interleukin-12, interleukin-15, and interleukin-2 on human immunodeficiency virus type 1 replication *in vitro*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; **3**: 547–553.
- [15] BECKER TC, WHERRY EJ, BOONE D, MURALI-KRISHNA K, ANTIA R, MA A, AHMED R. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 2002; **195**: 1541–1548.

- [16] BLANCO-JEREZ C, PLAZA JF, MASJUAN J, ORENSANZ LM, ALVAREZ-CERMENO JC. Increased levels of IL-15 mRNA in relapsing-remitting multiple sclerosis attacks. *J Neuroimmunol* 2002; **128**: 90–94.
- [17] BLASER BW, ROYCHOWDHURY S, KIM DJ, SCHWIND NR, BHATT D, YUAN W, KUSEWITT DF, FERKETICH AK, CALIGIURI MA, GUIMOND M. Donor Derived IL-15 is Critical for Acute Allogeneic Graft-Versus-Host Disease. *Blood* 2005; **105**: 894–901.
- [18] BUDUNELI E, GENEL F, ATILLA G, KUTUKCULER N. Evaluation of p53, bcl-2, and interleukin-15 levels in gingival crevicular fluid of cyclosporin A-treated patients. *J Periodontol* 2003; **74**: 506–511.
- [19] BURTON JD, BAMFORD RN, PETERS C, GRANT AJ, KURYS G, GOLDMAN CK, BRENNAN J, ROESSLER E, WALDMANN TA. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4935–4939.
- [20] CARDOZO AK, PROOST P, GYSEMANS C, CHEN MC, MATHIEU C, EIZIRIK DL. IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia* 2003; **46**: 255–266.
- [21] CARSON WE, GIRI JG, LINDEMANN MJ, LINETT ML, AHDIEH M, PAXTON R, ANDERSON D, EISENMANN J, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; **180**: 1395–1403.
- [22] CARSON WE, ROSS ME, BAIOCCHI RA, MARIEN MJ, BOIANI N, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2578–2582.
- [23] CASTELLI J, THOMAS EK, GILLIET M, LIU YJ, LEVY JA. Mature dendritic cells can enhance CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV responses: the role of IL-15. *Blood* 2004; **103**: 2699–2704.
- [24] CAVALIERI H, GAMBA G, COURREGES MC, MASSOUH EJ, BENENCIA F. Expression of IL-15, IL-18 and NOS-II in contralateral eyes of BALB/c mice during the development of HSV-induced keratitis. *Immunol Lett* 2005; **96**: 295–298.
- [25] CHIK KW, LI K, PONG H, SHING MM, LI CK, YUEN PM. Elevated serum interleukin-15 level in acute graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; **25**: 960–964.
- [26] CHO ML, KIM WU, MIN SY, MIN DJ, MIN JK, LEE SH, PARK SH, CHO CS, KIM HY. Cyclosporine differentially regulates interleukin-10, interleukin-15, and tumor necrosis factor a production by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 42–51.
- [27] CONTI F, FRAPPIER J, DHARANCY S, CHEREAU C, HOUSSIN D, WEILL B, CALMUS Y. Interleukin-15 production during liver allograft rejection in humans. *Transplantation* 2003; **76**: 210–216.
- [28] COOKSON S, DOHERTY DG, TODRYK S, GIBBS P, PORTMANN B, O'GRADY J, RELA M, HEATON N, NORRIS S. Hepatic expression of IL-15 mRNA is associated with liver graft acceptance. *Transpl Immunol* 2003; **11**: 39–48.
- [29] CORDERO OJ, SALGADO FJ, MERA-VARELA A, NOGUEIRA M. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001; **21**: 69–74.
- [30] D'ETTORRE G, FORCINA G, LICHTNER M, MENGONI F, D'AGOSTINO C, MASSETTI AP, MASTROIANNI CM, VULLO V. Interleukin-15 in HIV infection: immunological and virological interactions in antiretroviral-naive and -treated patients. *Aids* 2002; **16**: 181–188.
- [31] EBERT EC. IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN-gamma and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunology* 2005; **115**: 118–126.
- [32] FAWAZ LM, SHARIF-ASKARI E, MENEZES J. Up-regulation of NK cytotoxic activity via IL-15 induction by different viruses: a comparative study. *J Immunol* 1999; **163**: 4473–4480.
- [33] FERRARI-LACRAZ S, ZANELLI E, NEUBERG M, DONSKOY E, KIM YS, ZHENG XX, HANCOCK WW, MASLINSKI W, LI XC, STROM B, MOLL T. Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2004; **173**: 5818–5826.
- [34] FERRARI-LACRAZ S, ZHENG XX, KIM YS, LI Y, MASLINSKI W, LI XC, STROM TB. An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection. *J Immunol* 2001; **167**: 3478–3485.
- [35] FLAMAND L, STEFANESCU I, MENEZES J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1373–1381.



- [36] FORCINA G, D'ETTORRE G, MASTROIANNI CM, CARNEVALINI M, SCORZOLINI L, CECCARELLI G, D'AGOSTINO C, LICHTNER M, MASSETTI AP, VULLO V. Interleukin-15 modulates interferon-gamma and beta-chemokine production in patients with HIV infection: implications for immune-based therapy. *Cytokine* 2004; **25**: 283–290.
- [37] GILL N, ROSENTHAL KL, ASHKAR AA. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol* 2005; **79**: 4470–4478.
- [38] GILMOUR KC, FUJII H, CRANSTON T, DAVIES EG, KINNON C, GASPAR HB. Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood* 2001; **98**: 877–879.
- [39] GIORDANI L, GIACOMINI E, QUARANTA MG, VIORA M. HIV-1 Nef protein inhibits the *in vitro* induction of a specific antibody response to *Candida albicans* by an early up-regulation of IL-15 production. *Clin Exp Immunol* 2000; **122**: 358–363.
- [40] GOLDRATH AW, SIVAKUMAR PV, GLACCUM M, KENNEDY MK, BEVAN MJ, BENOIST C, MATHIS D, BUTZ EA. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 2002; **195**: 1515–1522.
- [41] GONZALEZ-ALVARO I, ORTIZ AM, GARCIA-VICUNA R, BALS A, PASCUAL-SALCEDO D, LAFON A. Increased serum levels of interleukin-15 in rheumatoid arthritis with long-term disease. *Clin Exp Rheumatol* 2003; **21**: 639–642.
- [42] GOSSELIN J, TOMOLU A, GALLO RC, FLAMAND L. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 1999; **94**: 4210–4219.
- [43] HARADA S, YAMAMURA M, OKAMOTO H, MORITA Y, KAWASHIMA M, AITA T, MAKINO H. Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1508–1516.
- [44] HOONTRAKOON R, CHU HW, GARDAI SJ, WENZEL SE, MCDONALD P, FADOK VA, HENSON PM, BRATTON DL. Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; **26**: 404–412.
- [45] ISHIMITSU R, NISHIMURA H, YAJIMA T, WATASE T, KAWAUCHI H, YOSHIKAI Y. Overexpression of IL-15 *in vivo* enhances Tc1 response, which inhibits allergic inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol* 2001; **166**: 1991–2001.
- [46] KACANI L, SPRINZL GM, ERDEI A, DIERICH MP. Interleukin-15 enhances HIV-1-driven polyclonal B-cell response *in vitro*. *Exp Clin Immunogenet* 1999; **16**: 162–172.
- [47] KACANI LH, STOIBER H, DIERICH MP. Role of IL-15 in HIV-1-associated hypergammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1997; **108**: 14–18.
- [48] KASYAPA CS, STENTZ CL, DAVEY MP, CARR DW. Regulation of IL-15-stimulated TNF-alpha production by rolipram. *J Immunol* 1999; **163**: 2836–2843.
- [49] KATSANIS E, XU Z, PANOSKALTSIS-MORTARI A, WEISDORF DJ, WIDMER MB, BLAZAR BR. IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice. *Transplantation* 1996; **62**: 872–875.
- [50] KIM YS, MASLINSKI W, ZHENG XX, STEVENS AC, LI XC, TESCH GH, KELLEY VR, STROM TB. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc gamma2a protein blocks delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1998; **160**: 5742–5748.
- [51] KIRMAN I, NIELSEN OH. Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1996; **91**: 1789–1794.
- [51a] KOJ A. Niektóre cytokiny przeciwzapalne – własności i działania. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 5–14.
- [52] KUMAKI S, MINEGISHI M, FUJIE H, SASAHARA Y, OHASHI Y, TSUCHIYA S, KONNO T. Prolonged secretion of IL-15 in patients with severe forms of acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in children. *Int J Hematol* 1998; **67**: 307–312.
- [53] KUROWSKA M, RUDNICKA W, KONTNY E, JANICKA I, CHORAZY M, KOWALCZEWSKI J, ZIOLKOWSKA M, FERRARI-LACRAZ S, STROM TB, MASLINSKI W. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J Immunol* 2002; **169**: 1760–1767.
- [54] KURZ T, STRAUCH K, DIETRICH H, BRAUN S, HIERL S, JERKIC SP, WIENKER TF, DEICHMANN KA, HEINZMANN A. Multilocus haplotype analyses reveal association between 5 novel IL-15 polymorphisms and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **113**: 896–901.

- [55] KUTZLER MA, ROBINSON TM, CHATTERGOON MA, CHOO DK, CHOO AY, CHOE PY, RAMANATHAN MP, PARKINSON R, KUDCHODKAR S, TAMURA Y, SIDHU M, ROOPCHAND V, KIM JJ, PAVLAKIS GN, FELBER BK, WALDMANN TA, BOYER JD, WEINER DB. Coimmunization with an Optimized IL-15 Plasmid Results in Enhanced Function and Longevity of CD8 T Cells That Are Partially Independent of CD4 T Cell Help. *J Immunol* 2005; **175**: 112–123.
- [56] LEWIS E, WEILER M, CHAIMOVITZ C, DOUVDEVANI A. Interleukin-15 is the main mediator of lymphocyte proliferation in cultures mixed with human kidney tubular epithelial cells. *Transplantation* 2001; **72**: 886–890.
- [57] LI XC, DEMIRICI G, FERRARI-LACRAZ S, GROVES C, COYLE A, MALEK TR, STROM TB. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells *in vivo*. *Nat Med* 2001; **7**: 114–118.
- [58] LIN SJ, ROBERTS RL, ANK BJ, NGUYEN QH, THOMAS EK, STIEHM ER. Human immunodeficiency virus (HIV) type-1 GP120-specific cell-mediated cytotoxicity (CMC) and natural killer (NK) activity in HIV-infected (HIV+) subjects: enhancement with interleukin-2(IL-2), IL-12, and IL-15. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; **82**: 163–173.
- [59] LIU CC, PERUSSIA B, YOUNG JD. The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol Today* 2000; **21**: 113–116.
- [60] LIU Z, GEBOES K, COLPAERT S, D'HAENS GR, RUTGEERTS P, CEUPPENS JL. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 2000; **164**: 3608–3615.
- [61] LOSER K, MEHLING A, APELT J, STANDER S, ANDRES PG, REINECKER HC, EING BR, SKRYABIN BV, VARGA G, SCHWARZ T, BEISSERT S. Enhanced contact hypersensitivity and antiviral immune responses *in vivo* by keratinocyte-targeted overexpression of IL-15. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 2022–2031.
- [62] LOSY J, NIEZGODA A, ZAREMBA J. IL-15 is elevated in sera of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Neuropathol* 2002; **40**: 151–153.
- [63] LUM JJ, SCHNEPPLE DJ, NIE Z, SANCHEZ-DARDON J, MBISA GL, MIHOWICH J, HAWLEY N, NARAYAN S, KIM JE, LYNCH DH, BADLEY AD. Differential effects of interleukin-7 and interleukin-15 on NK cell anti-human immunodeficiency virus activity. *J Virol* 2004; **78**: 6033–6042.
- [64] MAEKAWA Y, TSUKUMO S, OKADA H, KISHIHARA K, YASUTOMO K. Breakdown of peripheral T-cell tolerance by chronic interleukin-15 elevation. *Transplantation* 2003; **76**: 415–420.
- [65] MANFRO RC, ROY-CHAUDHURY P, ZHENG XX, STEIGER J, NICKERSON PW, LI Y, MASLINSKI W, STROM TB. Interleukin-15 gene transcripts are present in rejecting islet allografts. *Transplant Proc* 1997; **29**: 1077–1078.
- [66] MARKS-KONCZALIK J, DUBOIS S, LOSI JM, SABZEVARI H, YAMADA N, FEIGENBAUM L, WALDMANN TA, TAGAYA Y. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11445–11450.
- [67] MASTROIANNI CM, D'ETTORRE G, FORCINA G, LICHTNER M, MENGONI F, D'AGOSTIMO C, CORPOLONGO A, MASSETTI AP, VULLO V. Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000; **96**: 1979–1984.
- [68] MCINNES IB, AL-MUGHALES J, FIELD M, LEUNG BP, HUANG FP, DIXON R, STURROCK RD, WILKINSON PC, LIEW FY. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996; **2**: 175–182.
- [69] MCINNES IB, LEUNG BP, STURROCK RD, FIELD M, LIEW FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1997; **3**: 189–195.
- [70] MIN SY, HWANG SY, JUNG YO, JEONG J, PARK SH, CHO CS, KIM HY, KIM WU. Increase of cyclooxygenase-2 expression by interleukin 15 in rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol* 2004; **31**: 875–883.
- [71] MIRANDA-CARUS ME, Balsa A, BENITO-MIGUEL M, PEREZ DE AYALA C, MARTIN-MOLA E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. *J Immunol* 2004; **173**: 1463–1476.
- [72] MUELLER YM, BOJCZUK PM, HALSTEAD ES, KIM AH, WITEK J, ALTMAN JD, KATSIKIS PD. IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2003; **101**: 1024–1029.
- [73] MURO S, TAHA R, TSICOPOULOS A, OLIVENSTEIN R, TONNEL AB, CHRISTODOULOPOULOS P, WALLAERT B, HAMID Q. Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **108**: 970–975.



- [74] NAORA H, GOUGEON ML. Enhanced survival and potent expansion of the natural killer cell population of HIV-infected individuals by exogenous interleukin-15. *Immunol Lett* 1999; **68**: 359–367.
- [75] NOGUCHI M, YI H, ROSENBLATT HM, FILIPOVICH AH, ADELSTEIN S, MODI WS, MCBRIDE OW, LEONARD WJ. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993; **73**: 147–157.
- [76] OBAR JJ, CRIST SG, LEUNG EK, USHERWOOD EJ. IL-15-independent proliferative renewal of memory CD8+ T cells in latent gammaherpesvirus infection. *J Immunol* 2004; **173**: 2705–2714.
- [77] OGATA Y, KUKITA A, KUKITA T, KOMINE M, MIYAHARA A, MIYAZAKI S, KOHASHI O. A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J Immunol* 1999; **162**: 2754–2760.
- [78] OH S, BERZOFKY JA, BURKE DS, WALDMANN TA, PERERA LP. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 3392–3397.
- [79] OHTA N, HIROI T, KWEON MN, KINOSHITA N, JANG MH, MASHIMO T, MIYAZAKI J, KIYONO H. IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta+ NK1.1+ T cells for the development of small intestinal inflammation. *J Immunol* 2002; **169**: 460–468.
- [80] OHTEKI T, HO S, SUZUKI H, MAK TW, OHASHI PS. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* 1997; **159**: 5931–5935.
- [81] OHTEKI T, SUZUE K, MAKI C, OTA T, KOYASU S. Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat Immunol* 2001; **2**: 1138–1143.
- [82] ONG PY, HAMID QA, TRAVERS JB, STRICKLAND I, AL KERITHY M, BOGUNIEWICZ M, LEUNG DY. Decreased IL-15 may contribute to elevated IgE and acute inflammation in atopic dermatitis. *J Immunol* 2002; **168**: 505–510.
- [83] ORTIZ AM, GARCIA-VICUNA R, SANCHO D, LAFFON A, SANCHEZ-MADRID F, GONZALEZ-ALVARO I. Cyclosporin A inhibits CD69 expression induced on synovial fluid and peripheral blood lymphocytes by interleukin 15. *J Rheumatol* 2000; **27**: 2329–2338.
- [84] PARK YB, KIM DS, LEE WK, SUH CH, LEE SK. Elevated serum interleukin-15 levels in systemic lupus erythematosus. *Yonsei Med J* 1999; **40**: 343–348.
- [85] PASHENKOV M, MUSTAFA M, KIVISAKK P, LINK H. Levels of interleukin-15-expressing blood mononuclear cells are elevated in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 1999; **50**: 302–308.
- [86] PAVLAKIS M, STREHLAU J, LIPMAN M, SHAPIRO M, MASLINSKI W, STROM TB. Intra-graft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1996; **62**: 543–545.
- [87] PELLETIER M, GIRARD D. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 2005; **141**: 315–325.
- [88] QUARANTA MG, CAMPONESCHI B, STRAFACE E, MALORNI W, VIORA M. Induction of interleukin-15 production by HIV-1 nef protein: a role in the proliferation of uninfected cells. *Exp Cell Res* 1999; **250**: 112–121.
- [89] RAPPL G, KAPSOKEFALOU A, HEUSER C, ROSSLER M, UGUREL S, TILGEN W, REINHOLD U, ABKEN H. Dermal fibroblasts sustain proliferation of activated T cells via membrane-bound interleukin-15 upon long-term stimulation with tumor necrosis factor-alpha. *J Invest Dermatol* 2001; **116**: 102–109.
- [90] ROBAK E, ROBAK T, WOZNIACKA A, ZAK-PRELICH M, SYSA-JEDRZEJOWSKA A, STEPIEN H. Proinflammatory interferon-gamma-inducing monokines (interleukin-12, interleukin-18, interleukin-15) – serum profile in patients with systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 2002; **13**: 364–368.
- [91] ROTHE H, HAUSMANN A, KOLB H. Immunoregulation during disease progression in prediabetic NOD mice: inverse expression of arginase and prostaglandin H synthase 2 vs. interleukin-15. *Horm Metab Res* 2002; **34**: 7–12.
- [92] RUCHATZ H, LEUNG BP, WEI XQ, MCINNES IB, LIEW FY. Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol* 1998; **160**: 5654–5660.
- [93] RUCKERT R, ASADULLAH K, SEIFERT M, BUDAGIAN VM, ARNOLD R, TROMBOTTO C, PAUS R, BULFONE-PAUS S. Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol* 2000; **165**: 2240–2250.
- [94] RUTELLA S, PIERELLI L, BONANNO G, MARIOTTI A, SICA S, SORA F, CHIUSOLO P, SCAMBIA G, RUMI C, LEONE G. Immune reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of interleukin-15 on T-cell survival and effector functions. *Exp Hematol* 2001; **29**: 1503–1516.

- [95] SAKAI T, KUSUGAMI K, NISHIMURA H, ANDO T, YAMAGUCHI T, OHSUGA M, INA K, ENOMOTO A, KIMURA Y, YOSHIKAI Y. Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; **114**: 1237–1243.
- [96] SEDER RA, GRABSTEIN KH, BERZOFSKY JA, MCDYER JF. Cytokine interactions in human immunodeficiency virus-infected individuals: roles of interleukin (IL)-2, IL-12, and IL-15. *J Exp Med* 1995; **182**: 1067–1077.
- [97] SHI R, YANG J, JARAMILLO A, STEWARD NS, ALOUSH A, TRULOCK EP, ALEXANDER PATTERSON G, SUTHANTHIRAN M, MOHANAKUMAR T. Correlation between interleukin-15 and granzyme B expression and acute lung allograft rejection. *Transpl Immunol* 2004; **12**: 103–108.
- [98] SIGNORE A, ANNOVAZZI A, GIACALONE P, BEALES PE, VALORANI MG, VESTRI AR, RUBERTI G, MANFRINI S, POZZILLI P, BULFONE-PAUS S. Reduced cumulative incidence of diabetes but not insulinitis following administration of chimeric human IL-15-murine IgG2b in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; **19**: 464–468.
- [99] SILVA MA, MENEZES J, DESLANDRES C, SEIDMAN EG. Anti-inflammatory role of interleukin-15 in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; **11**: 219–230.
- [100] SMITH XG, BOLTON EM, RUCHATZ H, WEI X, LIEW FY, BRADLEY JA. Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival. *J Immunol* 2000; **165**: 3444–3450.
- [101] SUGIURA T, KAWAGUCHI Y, HARIGAI M, TAKAGI K, OHTA S, FUKASAWA C, HARA M, KAMATANI N. Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* 2000; **164**: 6593–6600.
- [102] THURKOW EW, VAN DER HEIJDEN IM, BREEDVELD FC, SMEETS TJ, DAHA MR, KLUIN PM, MEINDERS AE, TAK PP. Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with *Yersinia*-induced arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* 1997; **181**: 444–450.
- [103] TOKA FN, ROUSE BT. Mucosal application of plasmid-encoded IL-15 sustains a highly protective anti-Herpes simplex virus immunity. *J Leukoc Biol* 2005; **78**: 178–186.
- [104] TSUNOBUCHI H, NISHIMURA H, GOSHIMA F, DAIKOKU T, SUZUKI H, NAKASHIMA I, NISHIYAMA Y, YOSHIKAI Y. A protective role of interleukin-15 in a mouse model for systemic infection with herpes simplex virus. *Virology* 2000; **275**: 57–66.
- [105] URIBE L, WEINBERG KI. X-linked SCID and other defects of cytokine pathways. *Semin Hematol* 1998; **35**: 299–309.
- [106] VILLADSEN LS, SCHUURMAN J, BEURSKENS F, DAM TN, DAGNAES-HANSEN F, SKOV L, RYGAARD J, VOORHORST-OGINK MM, GERRITSEN AF, VAN DIJK MA, PARREN PW, BAADSGAARD O, VAN DE WINKEL JG. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1571–1580.
- [107] WEILER M, KACHKO L, CHAIMOVITZ, VAN KOOTEN C, DOUVDEVANI A. CD40 ligation enhances IL-15 production by tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 80–87.
- [108] WENG NP, LIU K, CATALFAMO M, LI Y, HENKART PA. IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. *Ann NY Acad Sci* 2002; **975**: 46–56.
- [109] WHERRY EJ, BECKER TC, BOONE D, KAJA MK, MA A, AHMED R. Homeostatic proliferation but not the generation of virus specific memory CD8 T cells is impaired in the absence of IL-15 or IL-15Ralpha. *Adv Exp Med Biol* 2002; **512**: 165–175.
- [110] WILKINSON PC, LIEW FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med* 1995; **181**: 1255–1259.
- [111] WU TS, LEE JM, LAI YG, HSU JC, TSAI CY, LEE YH, LIAO NS. Reduced expression of Bcl-2 in CD8+ T cells deficient in the IL-15 receptor alpha-chain. *J Immunol* 2002; **168**: 705–712.
- [112] XIN KQ, HAMAJIMA K, SASAKI S, TSUJI T, WATABE S, OKADA E, OKUDA K. IL-15 expression plasmid enhances cell-mediated immunity induced by an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine* 1999; **17**: 858–866.
- [113] YANG L, THORNTON S, GROM AA. Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 3010–3014.



- [114] ZAUNDERS JJ, MOUTOUH-DE PARSEVAL L, KITADA S, REED JC, ROUGHT S, GENINI D, LEONI L, KELLEHER A, COOPER DA, SMITH DE, GREY P, ESTAQUIER J, LITTLE S, RICHMAN DD, CORBEIL J. Polyclonal proliferation and apoptosis of CCR5+ T lymphocytes during primary human immunodeficiency virus type 1 infection: regulation by interleukin (IL)-2, IL-15, and Bcl-2. *J Infect Dis* 2003; **187**: 1735–1747.
- [115] ZIOLKOWSKA M, KOC A, LUSZCZYKIEWICZ G, KSIEZOPOLSKA-PIETRZAK, KLIMCZAK E, CHWALINSKA-SADOWSKA H, MASLINSKI W. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers *in vitro* IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000; **164**: 2832–2838.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 20.02. 2006 r.*

*Przyjęto: 24.04. 2006 r.*

*ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa;*

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





## ROŚLINNE IMMUNOFILINY STRUKTURA I FUNKCJE\*

### PLANT IMMUNOPHILINS – STRUCTURE AND FUNCTIONS

Agnieszka KIEŁBOWICZ-MATUK

Pracownia Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Genetyki Roślin  
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

**Streszczenie:** Pierwotnie zdefiniowane jako komórkowe receptory dla związków immunosupresyjnych, immunofiliny obejmują dwie rodziny unikatowych białek. Należą do nich białka wiążące FK506 określane terminem FKBP oraz białka wiążące cyklosporynę określane jako cyklofiliny. Występują one powszechnie w świecie organizmów żywych. Obecnie wiadomo, że genom *A. thaliana* zawiera 52 geny dla immunofilin, z tego 23 kodują białka FKBP, a 29 – cyklofiliny. Pomimo różnej budowy wszystkie immunofiliny mają aktywność enzymatyczną peptydylo-prolyl *cis-trans* izomerazy (PPIazy). Podczas gdy rolę FKBP i cyklofilin w procesie dojrzewania białek dobrze poznano, aktualny stan wiedzy na temat innych funkcji tych białek w komórce roślinnej jest ubogi. Sugeruje się, że jako znaczący składnik proteomu chloroplastów, immunofiliny mogą odgrywać istotną rolę w wielu procesach tam zachodzących. Ponadto analiza mutantów charakteryzujących się licznymi defektami rozwojowym dostarczyła dowodów na udział wielodomenowych immunofilin we wzroście i rozwoju roślin.

**Słowa kluczowe:** immunofiliny, cyklofiliny, białka FKBP, fałdowanie białek, peptydylo-prolyl *cis/trans* izomeraza.

**Summary:** Primary defined as the cellular receptors for immunosuppressive drugs, the immunophilins encompass two ubiquitous protein families. They consist of the FK506 binding proteins termed as FKBP and cyclosporin binding proteins referred to as cyclophilins. They have been found in all organisms. The 52 genes encode immunophilins have been identified in *A. thaliana* genome, among which 23 encode putative FKBP and 29 putative cyclophilins. Despite the various structure both families have peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity. Whilst the role of FKBP and cyclophilin in proteins maturation is well understanding, the current stage of knowledge of different functions of this ubiquitous protein family in plant cell is poor. As a significant component of the chloroplast proteome, immunophilins may play important roles in processes which take place in this subcellular compartment. Moreover, evidence for the role of multidomain immunophilins in plant growth and development comes from characterization of mutants showing very marked developmental abnormalities.

**Key words:** immunophilin, cyclophilin, FKBP proteins, protein folding, peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase.

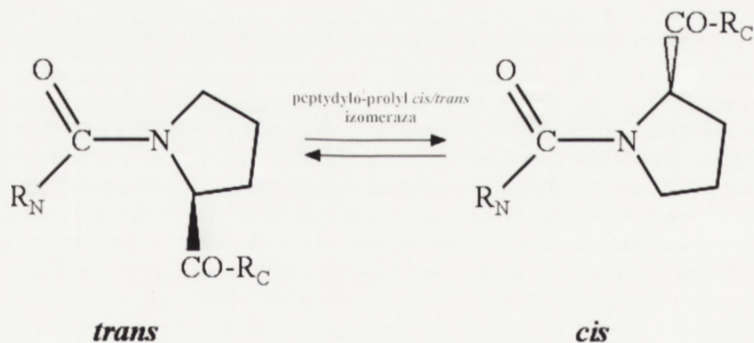
\*Praca dofinansowana przez Instytut Genetyki Roślin PAN.

## WSTĘP

Terminem immunofiliny określa się rodzinę białek o zachowawczej strukturze wiążących związki immunosupresyjne, takie jak: cyklosporyna A (CsA), FK-506 i rapamycyna. Należą do nich cyklofiliny (CYP) oraz białka FKBP (ang. *FK506 Binding Protein*), [40]. Występują one powszechnie w komórkach zwierząt, roślin wyższych, grzybów, pierwotniaków oraz u niektórych eubakterii [16]. Wszystkie immunofiliny pomimo różnej budowy mają aktywność izomerazy peptydyloprolylowej (PPIazy), która jest blokowana przez oddziaływanie ze specyficznymi immunosupresorami [8, 11, 30, 62, 77].

### 1. AKTYWNOŚĆ IZOMERAZOWA A FAŁDOWANIE BIAŁEK

Zanim nowo zsyntetyzowane łańcuchy białkowe będą zdolne poprawnie spełniać w komórce swoje funkcje, muszą zostać szybko i efektywnie przekształcone z ich pierwszorzędowej struktury liniowej do dobrze zdefiniowanej, funkcjonalnie kompetentnej struktury trzeciorzędowej. Podczas gdy fałdowanie globularnych polipeptydów o mniej złożonej strukturze następuje w czasie kilku sekund/milisekund, izomeryzacja wiązania imidowego Xaa-Pro (Xaa oznacza dowolny aminokwas), określanego także jako wiązanie peptydyloprolylowe, stanowi jeden z najwolniejszych etapów w procesie fałdowania białek. Obecnie wiadomo, że wiązanie prolylowe może występować w konformacji zarówno *cis*, jak i *trans* [39]. Prawdopodobnie, podczas translacji mRNA powstają wyłącznie wiązania *trans*, które w zależności od potrzeb zmieniane są na *cis*. Z termodynamicznego punktu widzenia przyjęcie przez białko danej konfiguracji w określonym miejscu łańcucha polipeptydowego musi być energetycznie najkorzystniejsze. Dlatego też wiązania *cis*-prolylowe są bardzo rzadkie (około 6% izomerów), podczas gdy *trans* izomery zwykle dominują [72]. Ponieważ etap izomeryzacji *cis/trans* jest jednym z najwolniej przebiegających w procesie fałdowania białek *in vitro*, może on determinować tempo osiągnięcia przez białko konformacji natywnej. Rolę enzymatycznych kataliza-



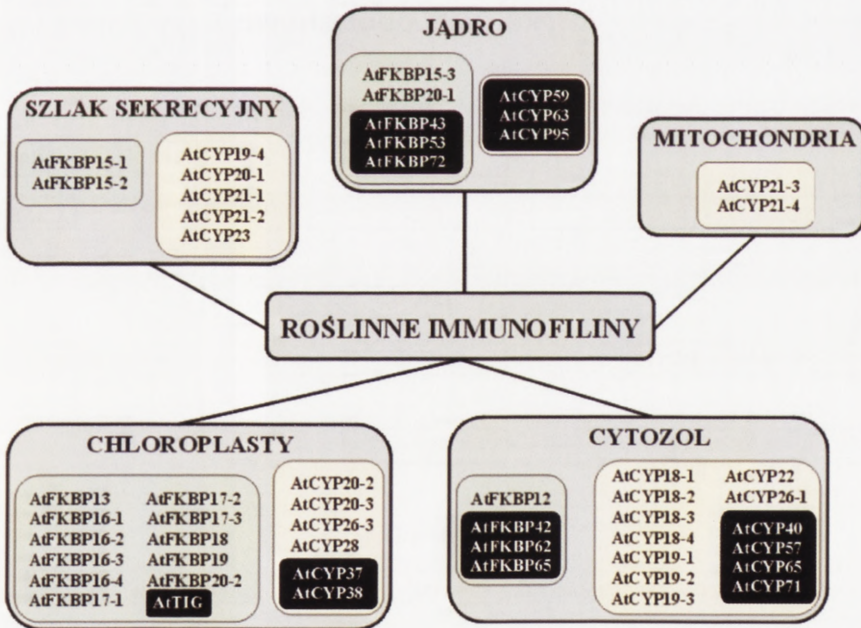
RYCINA 1. Mechanizm izomeryzacji wiązania peptydyloprolylowego *cis/trans* w obecności peptydyloprolyl *cis/trans* izomeraza (PPIaz)



torów, które biorą udział w przyspieszeniu tego procesu (ponad 300 razy) pełnią peptydylo-prolyl *cis/trans* izomerazy/rotamazy (PPlazy EC 5.1.2.8) (ryc. 1) [13, 14, 31, 80].

## 2. KLASYFIKACJA ROŚLINNYCH IMMUNOFILIN

Roślinne immunofiliny pierwotnie zostały wyizolowane w 1990 roku z pomidora (*Lycopersicon esculentum*), kukurydzy (*Zea mays*) i rzepaku (*Brassica napus*) [18]. Ukończenie programu sekwencjonowania modelowego genomu *A. thaliana* stało się bogatym źródłem wiedzy o strukturze genomów roślinnych oraz pozwoliło zidentyfikować potencjalne geny należące do rodziny immunofilin. Aktualne dane dowodzą, że u *Arabidopsis* występują 52 geny dla immunofilin, z tego 23 kodują białka FKBP, a 29 – cyklofiliny (ryc. 2) [75, 76]. Warto zaznaczyć, że liczba genów dla immunofilin u innych organizmów, których genom został w pełni zsekwenconowany jest znacznie niższa. Na przykład w genomie u *Saccharomyces cerevisiae* stwierdzono obecność 4 genów dla FKBP i 8 dla cyklofilin, a u *Caenorhabditis elegans* – 8 genów dla białek FKBP i 16 dla CYP [17, 34]. Natomiast w genomie człowieka liczba genów wynosi 18 i 24,



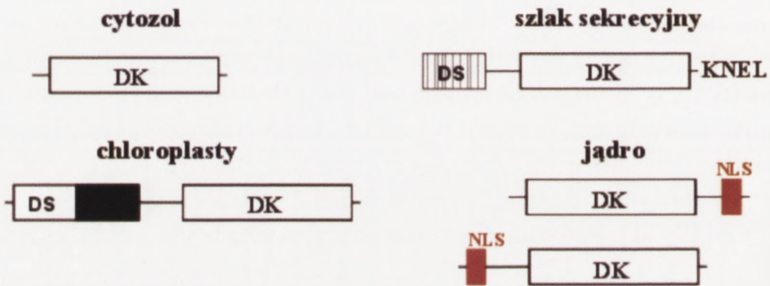
RYCINA 2. Lista 53 izoform roślinnych immunofilin z *A. thaliana* oraz ich subkomórkowa lokalizacja. Kolorem czarnym wpisano nazwy białek klasy jednodomenowej (SD), a kolorem białym należących do klasy wielodomenowej (MD) ([34, 75] zmienione)

odpowiednio dla białek FKBP i CYP. Badania wykazały, że u *Arabidopsis* geny dla immunofilin są rozmieszczone na wszystkich chromosomach, przy czym najwyższa liczba (17) występuje na chromosomie III. Tymczasem na chromosomach I, II, IV i V zlokalizowano odpowiednio 7, 8, 9 i 11 genów [34].

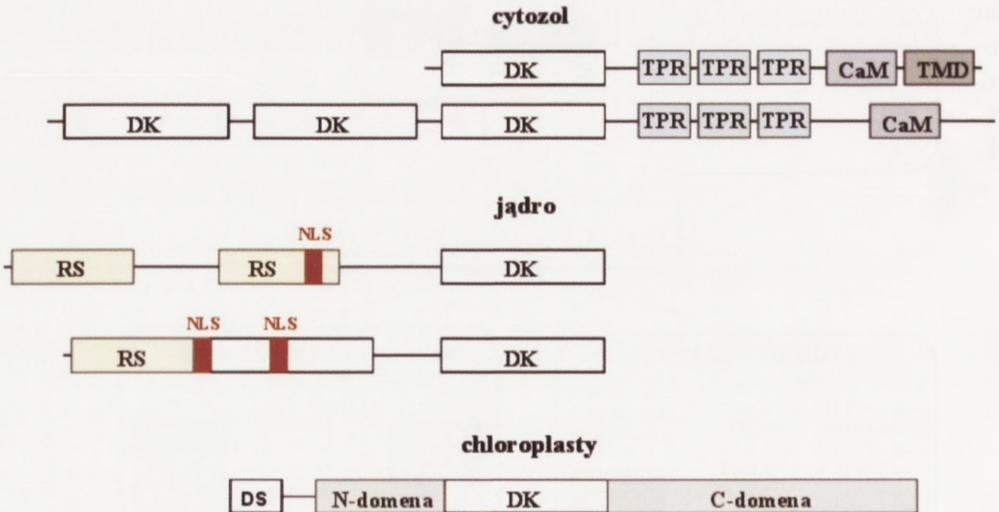
Aktualna klasyfikacja immunofilin roślinnych u *A. thaliana* została zaproponowana w 2004. Biorąc pod uwagę występowanie w cząsteczce białka różnych domen oraz

a

### FKBP JEDNODOMENOWE



### FKBP WIELODOMENOWE



*thaliana*: DK – domena katalityczna; DS – sekwencja docelowa; TMD – domena transmembranowa; TPR – powtórzenia TPR; S/K-R/E – rejony bogate w reszty Ser/Lys-Arg/Glu; U – domena U-box; CaM – domena wiążąca kalmoduling; WD40 – powtórzenia WD40; RRM – motyw rozpoznający RNA; R – rejon bogaty w Arg; NLS – sekwencja lokalizacji jądrowej; EK – rejon bogaty w reszty Glu-Lys; RS – rejon bogaty w reszty Arg-Ser; LZ – zamek leucynowy ([34, 75] zmienione)



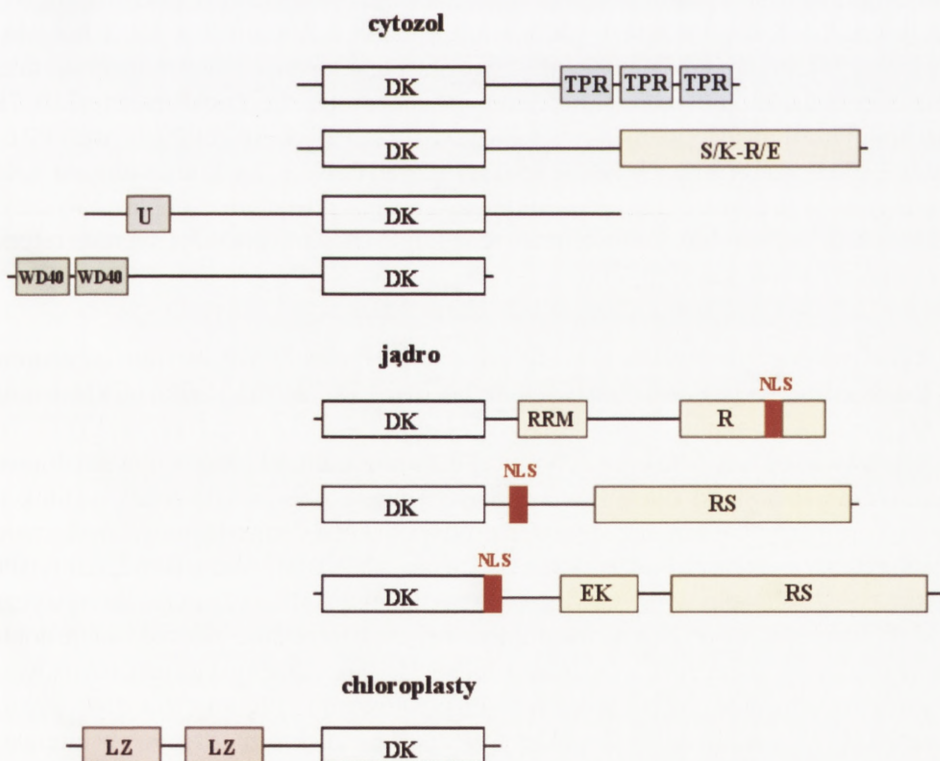
ich liczbę, wyodrębniono dwie klasy immunofilin: jednodomenowe, SD (ang. *Single Domain*) i wielodomenowe, MD (ang. *Multidomain*) [34, 75, 76]. Dodatkowo, w obrębie tych klas wyróżniono kilka grup białek o zróżnicowanych właściwościach i funkcjach.

b

## CYKLOFILINY JEDNODOMENOWE



## CYKLOFILINY WIELODOMENOWE



## 2.1. Subdomeny i subkomórkowa lokalizacja białek FKBP i CYP

### 2.1.1. Klasa SD

Członkowie klasy jednodomenowej charakteryzują się obecnością konserwatywnej domeny katalitycznej oraz występowaniem lub brakiem specyficznych sekwencji sygnałowych, kierujących białka do miejsca ich ostatecznej lokalizacji. Klasa SD stanowi najliczniejszą grupę immunofilin roślinnych. Obejmuje 16 izoform białek FKBP i 21 białek CYP zlokalizowanych głównie w cytozolu i w chloroplastach [34]. Największą frakcję (około 50%) stanowią białka, zawierające przy końcu aminowym presekwencję (zwaną także sekwencją tranzytową) kierującą białka do przestrzeni tylakoidowej [12, 34, 67, 73, 75]. Dodatni ładunek sekwencji docelowej oraz obecność w jej składzie dwóch reszt argininy sugeruje, że źródłem energii dla transportu białek przez błonę tylakoidu jest gradient pH [42, 60, 61]. Potwierdzeniem tego mogą być wyniki badań *in vitro* nad importem zlokalizowanych w świetle tylakoidów białek AtFKBP13 i AtCYP20-3 [29, 34, 75, 76]. Dostępne dane wskazują również na występowanie immunofilin klasy jednodomenowej w retikulum endoplazmatycznym, jądrze komórkowym i w mitochondriach (ryc. 3a, b) [34]. Ponadto niektóre cyklofiliny z tej grupy mogą wiązać się z błonami [74]. Warto zaznaczyć, że dotychczas u *A. thaliana* zidentyfikowano tylko dwie immunofiliny: AtCYP21-3 i AtCYP21-4 zlokalizowane w mitochondriach [75]. Pomimo że rola tych białek nie została jeszcze poznana, sugeruje się, że mitochondrialne cyklofiliny roślinne mogą pełnić podobne funkcje jak ich homologii zwierzęce [3]. Przymuszcza się, że regulują one przepuszczalność błony mitochondrialnej oraz odgrywają istotną rolę w śmierci komórki apoptotycznej i nekrotycznej [50, 78]. Inne immunofiliny jednodomenowe, takie jak: AtCYP19-4, AtCYP20-1, AtCYP21-1, AtCYP21-2, AtCYP23, AtFKBP15-1 i AtFKBP15-2, są kierowane na szlak sekrecyjny. W przeciwieństwie do zlokalizowanych w retikulum endoplazmatycznym białek FKBP, cyklofiliny kierowane do tego kompartmentu nie mają sygnału retencji przy końcu karboksylowym [75].

### 2.1.2. Klasa MD

Tylko dziewięć genów dla cyklofilin i siedem dla białek FKBP obecnych w genomie *A. thaliana* koduje immunofiliny wielodomenowe [34, 75, 76]. Białka tej klasy mogą występować w cytozolu, chloroplastach i w jądrze komórkowym (ryc. 3a, b) [75, 76]. Przedstawiciele klasy MD oprócz typowej dla immunofilin konserwatywnej domeny katalitycznej (bądź kilku domen katalitycznych) mają dodatkową domenę (-y) funkcjonalną. Warto przy tym zaznaczyć, że obecność wielu kopii domen katalitycznych stwierdzono tylko u niektórych białek FKBP, takich jak: AtFKBP42, AtFKBP62, AtFKBP65 i AtFKBP72. Ponadto w przeciwieństwie do białek FKBP, cechą charakterystyczną cyklofilin należących do klasy wielodomenowej jest bardzo duże zróżnicowanie domen funkcjonalnych. Wśród nich wyróżniono domenę U-box, domeny typu palca cynkowego i zamka leucynowego, powtórzenia WD-40, powtórzenia TPR (ang. *Tetratricopeptide Repeat*) [5, 75] oraz domeny charakterystyczne dla białek wchodzących w interakcje z RNA, tj. motyw RRM (ang. *RNA Recognition Motif*), rejon bogaty w reszty S/K-R/E oraz domenę bogatą w reszty Glu-Lys, tzw. EK lub Arg/Ser, tzw. RS [51, 53, 90].



### 3. STRUKTURA ROŚLINNYCH IMMUNOFILIN

Badania z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej, a następnie analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej poszczególnych izoform białkowych, pozwoliły określić strukturę drugorzędową roślinnych immunofilin. Pomimo braku istotnego podobieństwa pomiędzy członkami należącymi do rodziny FKBP i CYP, wszystkie immunofiliny mają kieszeń dla wiązania immunosupresorów [44, 49, 71]. Wykazano, że związki te trwale wiążą się z enzymem naśladując jego naturalne substraty, co w rezultacie powoduje nieznaczną reorganizację tego rejonu oraz prowadzi do zablokowania centrum aktywnego rotamazy [63].

#### 3.1. Budowa białek FKBP

Najlepiej poznane, a zarazem najpowszechniej występujące białko wiążące FK506 to FKBP12. FKBP12 jest rozpuszczalnym, cytozolowym receptorem dwóch immunosupresorów: FK506 i rapamycyny [71]. Głównymi elementami budowy tego białka są: pięciopasmowa, antyrównoległa struktura pofałdowanej harmonijki  $\beta$  i pojedyncza, krótka helisa  $\alpha$  tworząca rdzeń hydrofobowy [44]. W płytkim wydrążeniu między helisą i harmonijką znajduje się centrum aktywne oraz miejsce wiązania ligandu [91]. W kieszeni wiążącej ligand występują charakterystyczne, konserwatywne aminokwasy aromatyczne: Trp59, Tyr82 i Phe99, których obecność stwierdzono w innych białkach z tej rodziny.

#### 3.2. Budowa cyklofilin

Pierwszym białkiem wiążącym cyklosporynę A, którego strukturę najlepiej poznano, była ludzka cyklofilina A. Badania krystalograficzne wykazały, że tworzy ją osiem antyrównoległych struktur  $\beta$  osłoniętych przez dwie amfipatyczne helisy  $\alpha$  [1]. Rejon domeny katalitycznej stanowią silnie konserwatywne aminokwasy tworzące centrum aktywne enzymu, takie jak: Arg55, Phe60, Asn102, Phe113, Leu122 i His126 [37, 49]. Natomiast reszta tryptofanowa w pozycji 121 jest miejscem wiązania CsA [75]. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej wykazała, że unikatową cechą roślinnych cyklofilin jest obecność trzech insercji zlokalizowanych w rejonach połączeń  $\beta$ -I/ $\beta$ -II (3 lub 4 reszty aminokwasowe),  $\beta$ -IV/ $\beta$ -V (8 reszt aminokwasowych) i  $\beta$ -VI/ $\alpha$ -II (3–7 reszt aminokwasowych) [75].

### 4. EKSPRESJA GENÓW KODUJĄCYCH ROŚLINNE IMMUNOFILINY

Dane wielu autorów sugerują, że znaczna liczba genów dla immunofilin ulega ekspresji konstytutywnej w obrębie całej rośliny [5, 22, 41, 45]. Tym niemniej ekspresja niektórych izoform jest tkankowo-specyficzna. Na przykład cztery białka należące do klasy jednodomenowej: AtFKBP16-4, AtFKBP26-2, AtCYP22 i AtCYP28 z *A. thaliana* występują

zarówno w przestrzeni, jak i w błonach tylakoidowych [12, 15, 67, 73, 76]. Natomiast białko AtCYP20-3 jest obecne wyłącznie w stromie chloroplastów [82]. Inne izoformy, np. AtCYP26-1, są syntetyzowane wyłącznie w tkankach przewodzących [8, 75].

Na podstawie analizy ekspresji genów dla immunofilin stwierdzono, że niektóre z nich mogą być aktywowane pod wpływem stresów biotycznych i abiotycznych. Wzrost akumulacji transkryptów odnotowano w odpowiedzi na atak patogenów, szok termiczny, zranienie, jak również na obecność związków chemicznych, w tym chlorku rtęci i kwasu salicylowego [10, 22, 45, 52, 81]. Podwyższony poziom mRNA dla genów kodujących cyklofiliny u psianki (*Solanum commersoni*), bobu (*Vicia faba*) i kukurydzy (*Zea mays*) obserwowano również pod wpływem chłodu, suszy, zasolenia i ABA [22, 38, 58, 86].

## 5. RÓŻNORODNOŚĆ FUNKCJONALNA ROŚLINNYCH IMMUNOFILIN

Większość funkcji, jakie immunofiliny mogą pełnić w komórkach roślin, wykazano jedynie w warunkach *in vitro*. Wydaje się, że udział immunofilin w procesie łańcuchowania białek ma związek nie tylko z ich aktywnością izomerazową, ale również z przypisywaną im funkcją białek opiekuńczych. Prawdopodobnie w roślinach poddanych działaniu stresu immunofiliny mogą funkcjonować jako białka „opiekuńczo-podobne”, gdyż chronią nowo syntetyzowane łańcuchy białkowe przed ich agregacją i proteolityczną degradacją. Potwierdzeniem ochronnej roli tych białek było wykazanie, że niektóre immunofiliny mogą tworzyć kompleksy z białkami opiekuńczymi. Na przykład cyklofiliny Cpr6 i Cpr7 z *Saccharomyces cerevisiae* oraz białko AtFKBP-42 z *A. thaliana* mogą asocjować z białkiem Hsp90 [7, 43, 57].

Ciekawym odkryciem było stwierdzenie, że immunofiliny biorą udział w zależnej od ubikwityny degradacji białek [28]. Badania wykazały, że immunofiliny stymulują mechanizmy naprawcze biorące udział w degradacji białek o uszkodzonej pod wpływem stresu strukturze [4]. Interesującym przykładem jest przedstawiciel klasy wielodomowej – cyklofilina AtCYP65. Przy końcu aminowym cząsteczki białka zlokalizowano 60-aminokwasowy rejon o wysokiej homologii do domeny U-box. U-box jest zmodyfikowaną domeną typu *RING finger* (ang. *Really Interesting New Gene*) [26, 27, 28]. Występowanie domeny U-box stwierdzono m.in. u kilku ligaz ubikwitylowych. Ligazy ubikwitylowe są wielopodjednostkowymi kompleksami białkowymi, w których określone podjednostki biorą udział w rozpoznaniu przeznaczonego do degradacji substratu i dołączeniu do niego łańcucha poliubikwitylowego lub pojedynczymi polipeptydami, w których określone fragmenty cząsteczki pełnią tę rolę [28, 33]. Roślinne białka z domeną U-box zostały podzielone na pięć klas, które przypuszczalnie spełniają w komórce różne funkcje [4].

Ciekawym przykładem jest również cyklofilina AtCYP71, która na końcu aminowym ma dwa rejony o dużej homologii do sekwencji konsensusowych typu WD40. Obecność sekwencji WD40 stwierdzono między innymi w białku COP1 biorącym udział w regulacji fotomorfogenezy [70, 84, 85]. Wykazano, że oddziaływanie represora COP1 z czynni-



kiem transkrypcyjnym HY5 prowadzi do degradacji białka HY5 w układzie proteolitycznym (szlak ubikwityna/proteasom 26) [35, 36, 64, 79].

W ostatnich latach udowodniono również, że niektóre cytoplazmatyczne formy cyklofilin wykazują aktywność endonukleolityczną zależną od jonów wapnia i magnezu. Stąd przypisuje się im potencjalną rolę w apoptozie [55, 59].

Zdaniem wielu autorów pewne immunofiliny klasy wielodomenowej mogą brać udział w procesie konstytutywnego i alternatywnego splicingu oraz na różnych etapach dojrzewania cząsteczek RNA [47, 53, 54]. Na przykład w białku AtCYP59 zidentyfikowano motyw RRM, którego obecność stwierdzono również u wielu białek biorących udział w potranskrypcyjnym dojrzewaniu różnych rodzajów RNA (pre-mRNA, mRNA, pre-tRNA, cpRNA i małe jądrowe RNA) [2]. Inne cyklofiliny, takie jak AtCYP63 i AtCYP95, mają charakterystyczne dla białek SR (ang. *Splicing Factors Containing Ser-Arg Repeats*) domeny bogate w reszty Arg/Ser. Prawdopodobnie białka te mogą uczestniczyć w procesach związanych z formowaniem spliceosomu, interakcjach intron-egzon lub w wyborze właściwych miejsc splicingowych [24, 32]. Inna cyklofilina AtCYP59 przypuszczalnie bierze udział w wiązaniu RNA, ssDNA i w interakcjach białko-białko, albowiem w cząsteczce białka AtCYP59 zidentyfikowano domenę typu palca cynkowego istotną w tego typu oddziaływaniach [56].

Eksperymenty z wykorzystaniem systemu dwuhybrydowego pozwoliły zidentyfikować białka, z którymi oddziałują immunofiliny. Na przykład cyklofilina AtCYP18-3 silnie i specyficznie wiąże się z endonukleazą VirD2 z *Agrobacterium tumefaciens*, co wskazuje na jej potencjalną rolę w początkowych etapach integracji T-DNA do genomu roślinnego [9]. Co więcej, udowodniono, że CsA blokuje transformację *A. thaliana* i tytoniu (*Nicotiana tabacum*) za pomocą systemu *Agrobacterium tumefaciens*. Ostatnio zidentyfikowano również białko AtCYP5, które wchodzi w interakcję z czynnikiem wymiany GTP tzw. GNOM. Wykazano, że zasocjowany z błoną czynnik GNOM kieruje transportem pęcherzyków u wielu organizmów [25, 87]. W ostatnich latach uzyskano dodatkowe informacje o roli immunofilin w kierowaniu transportem białek [66].

## 6. CHLOROPLASTY – OGNISKOWY PUNKT DZIAŁANIA IMMUNOFILIN

Badania nad specyficznością oddziaływań enzymu z ligandem pozwoliły zidentyfikować immunofiliny w odległych kompartmentach komórkowych. Zaskakującym odkryciem było stwierdzenie, że pewne izoformy cyklofilin i białek FKBP występują w zielonych tkankach, a ich ekspresja jest indukowana światłem. Wykazano, że białka te są zlokalizowane w chloroplastach. Aktualnie wiadomo, że 15 izoform immunofilin występuje w przestrzeni tylakoidowej [76]. Przykładem może być występująca w świetle tylakoidu i w błonach tylakoidowych cyklofilina wielodomenowa TLP40 ze szpinaku (*Spinacea oleracea*) [73]. Przy końcu aminowym białka TLP40 zidentyfikowano domenę typu zamka leucynowego, która uczestniczy w wiązaniu białkowej fosfatazy, a przy końcu

karboksylowym ma domenę o aktywności izomerazowej. Udowodniono, iż nagły wzrost temperatury powoduje oddysocjowanie białka TLP40 od błony do światła tylakoidu, gdzie oddziałując z białkową fosfatazą moduluje jej aktywność. W rezultacie dochodzi do defosforylacji białek centrum reakcji fotosystemu II [73, 88].

Ostatnie dowody wskazują na istotną rolę stanu redoks w regulacji funkcji immunofilin [76]. Reakcje oksydoredukcyjne stanowią złożony system szlaków obejmujący fotosystem I i II oraz kompleks cytochromowy  $b_6f$  [83]. Wynikiem ich działania jest wytworzenie zredukowanych ekwiwalentów wykorzystywanych do syntezy węglowodanów w cyklu Calvina. Badania wykazały, że stan redoks reguluje transkrypcje genów kodowanych zarówno przez genom jądrowy, jak i chloroplastowy. Tym samym odgrywa on kluczową rolę w regulacji biologii chloroplastów na wielu poziomach [65, 69]. Za pośrednictwem specyficznych białek regulatorowych, tzw. tioredoksyn, redoks może być wskaźnikiem stanu energii w chloroplastach włączając bądź wyłączając aktywności wielu enzymów fazy ciemnej fotosyntezy. Dotychczas najlepiej scharakteryzowaną immunofiliną, której aktywność znajduje się pod kontrolą potencjału oksydoredukcyjnego, jest białko AtFKBP13 z *A. thaliana*. Aktualne dane wskazują na obecność trzech funkcjonalnie odległych form białka, które różnią się lokalizacją i stanem redoks [23]. Kluczowym odkryciem było stwierdzenie, że w przeciwieństwie do innych białek enzymatycznych, aktywacja białka AtFKBP13 następuje w wyniku utlenienia. Natomiast redukcja białka przez tioredoksynę hamuje jego aktywność enzymatyczną [27]. Tylko katalitycznie aktywna forma AtFKBP13 może brać udział w dojrzewaniu innych białek zlokalizowanych w przestrzeni i błonach tylakoidowych. Ostatnio udowodniono, że AtFKBP13 oddziałuje z podjednostką białka Rieske wchodzącą w skład kompleksu cytochromowego  $b_6f$ . Uważa się, że stan redoks odgrywa także rolę w funkcjonowaniu innych immunofilin, w tym zlokalizowanej w stromie cyklofiliny AtCYP20-3. Białko AtCYP20-3 pierwotnie zostało zidentyfikowane jako potencjalny substrat dla chloroplastowej tioredoksyny-*m* [61, 75]. Wykazano, że utleniona forma AtCYP20-3 jest katalitycznie nieaktywna, a jej aktywność izomerazowa może być przywrócona w wyniku redukcji przez chloroplastową tioredoksynę-*m*. Od niedawna wiadomo również, że białko AtCYP20-3 może oddziaływać w warunkach *in vitro* z peroksyredoksyną [48].

Warto wspomnieć, że dalece spokrewnionym, a zarazem interesującym przedstawicielem chloroplastowych immunofilin klasy wielodomenowej jest czynnik inicjujący TIG. Czynnik inicjujący jest białkiem opiekuńczym, który wiąże się z nowo syntetyzowanym łańcuchem polipeptydowym tuż po wynurzeniu się z rybosomu i przyspiesza jego fałdowanie (20–100x). Ostatnie dane dowodzą, że czynnik TIG może wiązać się z kompleksem cząsteczek rozpoznających sygnał rybosomowy, tzw. SRP (ang. *Ribosome-Signal Recognition Particle*) [6, 21].

Mówiąc o funkcji, jaką immunofiliny pełnią w chloroplastach, należałoby również zaznaczyć, że niektóre cyklofiliny mogą uczestniczyć w sekwestracji i ochronie białek chloroplastowych przeznaczonych do degradacji [82].



## 7. ROLA IMMUNOFILIN W ROZWOJU ROŚLIN

Większość danych na temat funkcji immunofilin we wzroście i różnicowaniu się komórek pochodzi z badań nad mutantami rozwojowymi *A. thaliana*. Jednym z nich jest mutant SQUINT, który charakteryzuje się zredukowaną liczbą liści i zmianami w ich morfologii [5]. Złożony fenotyp obserwowany u mutantu SQUINT jest spowodowany mutacją w genie *SQN*. Analiza sekwencji aminokwasowej białka SQN wykazała wysoką homologię do cyklofiliny CYP40 z *A. thaliana*. Przy końcu aminowym białka SQN zidentyfikowano obecność domeny o aktywności izomerazowej, a przy końcu karboksylowym trzech motywów TPR [8]. Badania wykazały, że białko CYP40 pełni ważną funkcję w początkowych etapach rozwoju siewek, jak również w morfogenezie kwiatów i położeniu pąków kwiatowych [5].

Dodatkowe dowody wskazujące na rolę wielodomenowych białek FKBP w rozwoju roślin pochodzą z charakterystyki mutantów określanych terminem *twisted dwarf 1 (TWD)* [19] i *ultracurvata 2 (UCU2)* [68]. Oba mutanty oznaczają się plejotropowym fenotypem. Pod względem morfologicznym rośliny charakteryzują się obecnością karłowatych liści, zniekształconych korzeni i łodyg oraz występowaniem kilku, małych kwiatów, co jest przyczyną częściowej redukcji płodności. Ponadto obserwuje się helikalne skrócenie wielu organów. Okazało się, że skrajny fenotyp reprezentowany przez mutanty *TWD* i *UCU2* jest spowodowany mutacją w genie *AtFKBP42* [43]. W strukturze białka *AtFKBP42* można wyróżnić obecną przy końcu aminowym nieaktywną domenę izomerazową, domenę TPR, trzy motywy wiążące kalmodulinę oraz zlokalizowaną przy końcu karboksylowym domenę transmembranową [75]. Badania wykazały, że zakotwiczone w błonie białko *AtFKBP42* występuje zarówno w membranach wakuolarnych, jak i plazmatycznych [19, 20, 43].

Pojawiają się coraz nowsze dowody przemawiające za rolą immunofilin w procesie rozwoju roślin. Ostatnio zidentyfikowano i scharakteryzowano zlokalizowane w jądrze białko KIN241 z *Paramecium tetraurelia*, które bierze udział w morfogenezie komórki i reorganizacji jądra [46]. Analiza sekwencji ujawniła, że KIN241 wykazuje dużą homologię do cyklofiliny *AtCYP59* z *A. thaliana*. Znane jest również białko *AtFIP37* oddziałujące z *AtFKBP12*, którego funkcja jest istotna w rozwoju bielma i na wczesnych etapach embriogenezy [89].

### PODSUMOWANIE

W ostatnich latach obserwuje się prawdziwy renesans badań funkcji immunofilin roślinnych. Ciągle jeszcze dużo pytań dotyczących roli tych białek w komórkach pozostaje bez odpowiedzi. Obecny stan wiedzy pozwala przypuszczać, że „cele” białek CYP i FKBP w komórce są różnorodne i specyficzne dla poszczególnych izoform. Wydaje się zatem słusznym stwierdzenie, że enzymy te odgrywają ważną rolę w biologii wielu organizmów.

## PODZIĘKOWANIE

Autorka pracy dziękuje Panu doc. dr hab. Tadeuszowi Roratowi za cenne uwagi w trakcie pisania pracy.

## LITERATURA

- [1] AGARWAL PK. Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microbial Cell Factories* 2006; **5**: 2–40.
- [2] ALBŘ MM, AND PAGČS M. Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 15–21.
- [3] ARPAGAUS S, RAWYLER A, BRAENDLE R. Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J Biol Chem* 2002; **277**: 1780–1787.
- [4] AZEVEDO C, SANTOS-ROSA MJ, SHIRASU K. The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 354–358.
- [5] BERARDINI TZ, BOLLMAN K, SUN H, POETHIG RS. Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science* 2001; **291**: 2405–2407.
- [6] BUSKIEWICZ I, DEUERLING E, GU SQ, JÖCKEL J, RODNINA MV, BUKAU B, WINTERMEYER W. Trigger factor binds to ribosome-signal-recognition particle (SRP) complexes and is excluded by binding of the SRP receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 7902–7906.
- [7] CARRELLO A, ALLAN RK, MORGAN SL, OWEN BA, MOK D, WARD BK, MINCHIN RF, TOFT DO, RATAJCZAK T. Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones* 2004; **9**: 167–181.
- [8] CHOU IT, GASSER CS. Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana* and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 873–892.
- [9] DENG WY, CHEN LS, WOOD DW, METCALFET, LIANG XY, GORDON MP, COMAI L, NESTER EW. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7040–7045.
- [10] DUAN H, SCHULER MA. Differential expression and evolution of the *Arabidopsis* CYP86A subfamily. *Plant Physiol* 2005; **137**: 1067–1081.
- [11] DUMONT FJ. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem* 2000; **7**: 731–748.
- [12] EDVARDSSON A, ESHAGHI S, VENER AV, ANDERSSON B. The major peptidyl-prolyl isomerase activity in thylakoid lumen of plant chloroplasts belongs to a novel cyclophilin TLP20. *FEBS Lett* 2003; **542**: 137–141.
- [13] EISENMESSER EZ, BOSCO DA, AKKE M, KERN D. Enzyme dynamics during catalysis. *Science* 2002; **295**: 1520–1523.
- [14] FISCHER G, AUMÜLLER T. Regulation of peptide bond *cis/trans* isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev Physiol Biochem Pharmacology* 2003; **148**: 105–150.
- [15] FRISCO G, GIACOMELLI L, YTTERBERG AJ, PELTIER J-B, RUDELLA A, SUN Q, VAN WIJK KJ. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions and a plastid proteome database. *Plant Cell* 2004; **16**: 478–499.
- [16] GALAT A. Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 4945–4959.
- [17] GALAT A. A note on clustering the functionally-related paralogues and orthologues of proteins: a case of the FK506-binding proteins (FKBPs). *Comput Biol Chem* 2004; **2**: 129–140.
- [18] GASSER CS, GUNNING DA, BUDELIER KA, BROWN SM. Structure and expression of cytosolic cyclophilin peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase of higher-plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9519–9523.
- [19] GEISLER M, KOLUKISA OGLU HU, BOUCHARD R, BILLION K, BERGER J, SAAL B, FRANGNE N, KONCZ-KALMAN Z, KONCZ C, DUDLER R, BLAKESLEE JJ, MURPHY AS, MARTINOIA E, SCHULZ B. *TWISTED DWARF1*, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Mol Biol Cell* 2003; **1**: 4238–4249.



- [20] GEISLER M, GIRIN M, BRANDT S, VINCENZETTI V, PLAZA S, PARIS N, KOBAE Y, MAESHIMA M, BILLION K, KOLUKISA OGLU UH, SCHULZ B, MARTINOLA E. *Arabidopsis* immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 3393–3405.
- [21] GENEVAUX P, KEPPEL F, SCHWAGER F, LANGENDIJK-GENEVAUX PS, HARTL FU, GEORGOPOULOS C. *In vivo* analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *EMBO Rep* 2004; **5**: 195–200.
- [22] GODOY AV, LAZZARO AS, CASALONGUE CA, SAN SEGUNDO B. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Sci* 2000; **152**: 123–134.
- [23] GOPLAN G, HE Z, BALMER Y, ROMANO P, GUPTA R, HÉROUX A, BUCHANAN BB, SWAMINATHAN K, LUAN S. Structural analysis uncovers a role for redox in regulating FKBP13, an immunophilin of the chloroplast thylakoid lumen. *PNAS* 2004; **38**: 13945–13950.
- [24] GRAVELEY BR. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 2000; **6**: 1197–1211.
- [25] GREBE M, GADEA J, STEINMANN T, KIENTZ M, RAHFELD JU, SALCHERT K, KONCZ C, JURGENS G. A conserved domain of the *Arabidopsis* GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding. *Plant Cell* 2000; **12**: 343–356.
- [26] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubikwitynacji. *Post Biochem* 2002; **48**: 34–47.
- [27] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Oligo- i monomeryczne ligazy ubikwitynowe E3 z domeną RING finger – budowa i działanie. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 373–392.
- [28] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Zależna od ubikwityny degradacja białek. Nagroda Nobla z chemii w 2004 roku. *Kosmos* 2005; **2–3**: 133–148.
- [29] GUPTA R, MOULD RM, HE Z, LUAN S. A chloroplast FKBP interacts with and affects the accumulation of Rieseke subunit of cytochrome *bc* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15806–15811.
- [30] HAFIZI S, MORDI VN, ANDERSSON KM, CHESTER AH, YACOUN MH. Differential effects of rapamycin, cyclosporine A, and FK506 on human coronary artery smooth muscle cell proliferation and signalling. *Vascular Pharmacology* 2005; **41**: 167–176.
- [31] HARRAR Y, BELLINI C, FAURE J-D. FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 426–431.
- [32] HASTINGS ML, KRAINER AR. Functions of SR proteins in the U12-dependent AT-AC pre-mRNA splicing pathway. *RNA* 2001; **7**: 471–482.
- [33] HATAKEYAMA S, NAKAYAMA KI. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **302**: 635–645.
- [34] HE Z, LI L, LUAN S. Immunophilins and Parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2004; **134**: 1248–1267.
- [35] HOECKER U, QUAIL PH. The phytochrome A – specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2001; **276**: 38173–38178.
- [36] HOLM M, HARDTKE CS, GAUDET R, DENG XW. Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J* 2001; **20**: 118–127.
- [37] HOWARD BR, VAJDOS FF, LI S, SUNDQUIST WI, HILL CHP. Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A. *Nature Struct Biol* 2003; **6**: 475–481.
- [38] HUANG W, LIN QF, LI GY, ZHAO WM. Identification and expression analysis of the cyclophilin gene in *Kandelia candel* under stress of salt. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 2003; **36**: 209–214.
- [39] HUR S, BRUCE TC. The mechanism of *cis-trans* isomerization of prolyl peptides by cyclophilin. *J Am Chem Soc* 2002; **124**: 7303–7313.
- [40] IVERY MT. Immunophilins: switched on protein binding domains? *Med Res Rev* 2000; **20**: 452–484.
- [41] JACKSON K, SOLL D. Mutation in a new *Arabidopsis* cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A. *Mol Gen Genet* 1999; **262**: 830–838.
- [42] JOHNSON G. Controversy remains: regulation of pH gradient across the thylakoid membrane. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 570–571.
- [43] KAMPHAUSEN T, FANGHANEL J, NEUMANN D, SCHULZ B, RAHFELD JU. Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90. *Plant J* 2002; **32**: 263–276.
- [44] KOCHER I, STRZADALA L. FK506-binding proteins in the regulation of transcription factors activity in T cells. *Post Hig Med Dośw* 2004; **27**: 118–127.
- [45] KONG HY, LEE SC, HWANG BK. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. *Physiol Mol Plant Pathol* 2001; **59**: 189–199.

- [46] KRZYWICKA A, BEISSON J, KELLER AM, COHEN J, JERKA-DZIADOSZ M, KLOTZ C. KIN241: A gene involved in cell morphogenesis in *Paramecium tetraurelia* reveals a novel protein family of cyclophilin-RNA interacting proteins (CRIPs) conserved from fission yeast to man. *Mol Microbiol* 2001; **42**: 257–267.
- [47] LAMBERMON MH, SIMPSON GG, WIECZOREK , KRIK DA, HEMMINGS-MIESZCZAK M, KLAHRE U, FILIPOWICZ W. UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO J* 2000; **19**: 1638–1649.
- [48] LEE SP, HWANG YS, KIM YJ, KWON KS, KIM HJ, KIM K, CHAE HZ. Cyclophilin binds to peroxi-redoxins and activates its peroxidase activity. *J Biol Chem* 2001; **276**: 29826–29832.
- [49] LI G, CUI Q. What is special about Arg 55 in the catalysis of cyclophilin A? Insights from hybrid QM/MM simulations. *J Am Chem Soc* 2003; **125**: 15028–15038.
- [50] LIN DT, LECHLEITER JD. Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31134–31141.
- [51] LIN CHL, LEU S, LU MCH, OUYANG PIN. Over-expression of SR-cyclophilin, an interaction partner of nuclear pinin, releases SR family splicing factors from nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 638–647.
- [52] LUAN S, LANE WS, SCHREIBER SL. pCyp B: A chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from Fava bean. *Plant Cell* 1994; **6**: 885–892.
- [53] LORKOVIĆ ZJ, BARTA A. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 623–635.
- [54] LORKOVIĆ ZJ, LOPATOS S, PEXA M, LEHNER R, BARTA A. Interaction of *Arabidopsis* RE domain containing cyclophilins with SR proteins and U1 and U11 small nuclear ribonucleoprotein-specific proteins suggest their involvement in pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2004; **32**: 33890–33898.
- [55] MANTECA A, SANCHEZ J. Recombinant cyclophilins lack nuclease activity. *J Bacteriol* 2004; **18**: 6325–6326.
- [56] MATTHEWS JM, SUNDE M. Zing fingers-folds for many occasions. *IUBMB Life* 2002; **54**: 351–355.
- [57] MAYR CH, RICHTER K, LILIE H, BUCHNER J. Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae*, differ in their functional properties. *J Biol Chem* 2000; **275**: 34140–34146.
- [58] MEZA-ZAPEDA LA, BAUDO MM, PALVA ET, HEINO P. Isolation and characterization of a cDNA corresponding to a stress-activated cyclophilin gene in *Solanum commersoni*. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1451–1452.
- [59] MONTAGUE JW, HUGHES FM, CIDLOWSKI J, CIDLOWSKI JA. Native Recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl *cis-trans*-isomerase activity. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6677–6684.
- [60] MORI H, CLINE K. Post-translational protein translocation into tylakoids by the Sec and DeltapH-dependent pathways. *Biochem Biophys Acta* 2001; **1541**: 80–90.
- [61] MOTOHASHI K, KONDOH A, STUMPP MT, HISABORI T. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast tioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **98**: 11224–11229.
- [62] NAKAMURA T. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of FKBP23, a novel FK506-binding protein with Ca<sup>2+</sup>-binding ability. *Genomics* 1998; **54**: 89–98.
- [63] NEYE H. Mutation of FKBP associated protein 48 (FAP48) at proline 219 disrupts the interaction with FKBP12 and FKBP52. *Regul Pept* 2001; **97**: 147–152.
- [64] OSTERLUND MT, HARDTKE CS, WEI N, DENG XW. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 2000; **405**: 462–466.
- [65] OSWALD O, MRTIN T, DOMINY PJ, GRAHAM AG. Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **98**: 2047–2052.
- [66] PATTERSON CE, SCHAUB T, COLEMAN EJ, DAVIS EC. Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 3925–3935.
- [67] PELTIER JB, EMANUELSSON O, KALUME DE, YTTERBERG J, FRISO G, RUDELLA A, LIBERLES DA, SODERBERG L, ROEPSTORFF P, VON HEIJNE G, VAN WIJK KJ. Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 2002; **14**: 211–236.
- [68] PÉREZ-PÉREZ JM, PONCE MR, MICOL JL. The *ULTRACURVATA2* gene of *Arabidopsis* encodes an FKBP506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant J* 2004; **134**: 101–117.
- [69] PFANNSCHMIDT T. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 33–41.



- [70] PICKART CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**: 503–533.
- [71] RAUGHT B. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 7037–7044.
- [72] REIMER U, FISCHER G. Local structural changes caused by peptidyl prolyl *cis/trans* isomerization in the native state of proteins. *Biophys Chem* 2002; **96**: 203–112.
- [73] ROKKA A, ARO E-M, HERRMANN RG, ANDERSSON B, VENER AV. Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins on plant photosynthetic membranes as an immediate response to abrupt elevation of temperature. *Plant Physiol* 2000; **123**: 1525–1535.
- [74] ROMANO PGN, EDVARDSSON A, RUBAN AV, ANDERSSON B, VENER AV, GRAY JE, HORTON P. *Arabidopsis* AtCYP20-2 is a light-regulated cyclophilin-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase associated with the photosynthetic membranes. *Plant Physiol* 2004a; **134**: 1244–1247.
- [75] ROMANO PGN, HORTON P, GRAY JE. The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. *Plant Physiol* 2004b; **134**: 1268–1282.
- [76] ROMANO PGN, GRAY JE, HORTON P, LUAN S. Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation. *New Phytol.* 2005; **166**: 753–769.
- [77] ROVIRA P, MASCARELL L, TRUFFA-BACHI P. The impact of immunosuppressive drugs on the analysis of T-cell activation. *Curr Med Chem* 2000; **7**: 673–692.
- [78] RUPNIEWSKA Z, BOJARSKA-JUNAK A. Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Post Hig Med Dośw* 2004; **58**: 538–547.
- [79] SAIJO Y, SULLIVAN JA, WANG H, YANG J, SHEN Y, RUBIO V, MA L, HOECKER U, DENG XW. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes and Development* 2003; **17**: 2642–2647.
- [80] SCHIENE-FISCHER C, YU C. Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase. *FEBS Lett* 2001; **495**: 1–6.
- [81] SCHOLZE C, PETERSON A, DIETRICH B, LUCKNER M. Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*: sequences and expression during embryogenesis and stress. *J Plant Physiol* 1999; **155**: 212–219.
- [82] SCHUBERT M, PETERSSON UA, HAAS BJ, FUNK C, SCHRÖDER WP, KIESELBACH T. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 8354–8365.
- [83] SCHÜRMANN P, JACQUOT J-P. Plant thioredoxin systems revisited. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 371–400.
- [84] SCHWECHHEIMER C, DENG XW. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 420–426.
- [85] SEO SH, ISHIKAWA M, BOLLE B, BALLESTEROS ML, CHUA NH. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 2003; **423**: 995–999.
- [86] SHARMA AD, SINGH P. Effect of water stress on expression of a 20 kDa cyclophilin-like protein in drought susceptible and tolerant cultivars of *Sorghum*. *J Plant Biochem Bioph* 2004; **12**: 77–80.
- [87] 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.
- [88] VENER AV, ROKKA A, FULGOSI H, ANDERSSON B, HERRMANN RG. A cyclophilin-regulated PP2A-like protein phosphatase in thylakoid membranes of plant chloroplasts. *Biochem* 1999; **38**: 14955–14965.
- [89] VESPA L, VACHON G, BERGER F, PERAZZA D, FAURE JD, HERZOG M. The immunophilin interacting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant Physiol* 2004; **134**: 1283–1292.
- [90] WEIGHARDT F, COBIANCHI F, CARTWIGNI L, CHIODI I, VILLA A, RIVA S, BIAMONTI G. A novel hnRNP protein (HAP/SAF B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J Cell Sci* 2004; **112**: 1465–1476.
- [91] ZACHARIAS M. Rapid protein-ligand docking using soft models from molecular dynamics simulations to account for protein deformability: binding of FK506 to FKBP. *Proteins* 2004; **54**: 759–767.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 09.02.2006 r.

Przyjęto: 24.04.2006 r.

ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

e-mail: akie@igr.poznan.pl

## W tym Zeszycie

- W oku kręgowców występują dwa funkcjonalnie odmienne szlaki odbioru światła. Jeden z nich służy do tworzenia obrazów (pręciki i czopki), a drugi rejestruje zmiany intensywności promieniowania w czasie i uczestniczy w tzw. niewzrokowych odpowiedziach na światło (regulacji rytmów biologicznych, zwięzaniu źrenicy). W tym drugim szlaku uczestniczy melanosyna, której budowa i funkcje są omawiane w artykule na stronie 229.
- W krajach wysoko rozwiniętych rak stercza jest drugą po raku płuca przyczyną zgonu mężczyzn. Badania *in vitro* na liniach komórkowych wyizolowanych z przerzutów raka przyczyniają się do poznania mechanizmu tego procesu. W artykule na stronie 257 omówiono cząsteczki adhezyjne i niektóre antygeny komórek raka prostaty biorące udział w adhezji, co ma znaczenia w powstawaniu przerzutów.
- Powstawanie osteoklastów jest procesem tworzenia wielojądrowych komórek zdolnych do resorbowania macierzy kostnej. Komórki te powstają przez fuzję makrofażów regulowaną cytokinami oraz ligandami uwalnianymi lub eksponowanymi przez komórki kościotwórcze. Więcej na ten temat Czytelnik znajdzie na stronie 273.
- Metalotioneiny to niskocząsteczkowe białka bogate w reszty cysteinowe, zdolne do wiązania metali ciężkich. Większość metalotionein roślinnych podlega ekspresji tkankowospecyficznej. Więcej na ten temat jest na stronie 285.
- Interleukina 15 ma wielokierunkowy wpływ na układ odpornościowy. Cytokina ta stanowi czynnik wzrostu dla limfocytów T CD8<sup>+</sup> pamięci oraz działa na nie antyapoptotycznie. Indukuje powstawanie komórek NK i nasila ich aktywność cytotoksyczną. Więcej na temat tej interleukiny oraz jej znaczenia w procesach chorobowych znajdzie Czytelnik na stronie 303 oraz 327.
- Somitogeneza, w czasie której z trzyosiowej mezodermy tworzą się somity, jest podstawą segmentacji ciała u kręgowców. Komórki trzyosiowej mezodermy przechodzą przez trzy fazy różnicowania i dojrzewania. W pierwszej fazie komórki macierzyste przekształcają się w komórki progenitorowe tworzące mezodermę przedsomitową. Potem następuje faza przygotowania do segmentacji oraz segmentacja. W artykule na stronie 393 omówiono mechanizm działania molekularnego oscylacyjnego zegara u zarodków, regulującego somitogenezę.



## PTEN – BIAŁKO SUPRESOROWE: REGULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁKA I EKSPRESJI GENU\*

### PTEN – TUMOUR SUPPRESSOR PROTEIN: REGULATION OF PROTEIN ACTIVITY AND GENE EXPRESSION

Barbara KRAWCZYK, Piotr RYCHLEWSKI,  
Krystyna FABIANOWSKA-MAJEWSKA

Zakład Chemii Biomedycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Streszczenie:** PTEN (nazywany także MMAC1 lub TEP1) jest białkiem supresorowym z aktywnością fosfatazy o podwójnej specyficzności zarówno wobec substratu lipidowego, jak i substratów białkowych. Jako fosfataza lipidowa, PTEN defosforyluje fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP-3), co prowadzi do negatywnej regulacji aktywności serynowo-treoninowej kinazy Akt (PKB). Jako fosfataza białek, PTEN poprzez defosforylację kinazy białkowej FAK i białka Shc uczestniczy w regulacji szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP. Lipidowo-białkowa aktywność fosfatazowa PTEN powoduje, że białko to jest modulatorem dwóch głównych wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu sygnału: czynniki wzrostu/PI3K/Akt oraz Shc/Ras/Raf/MAPK, tj. szlaków kontrolujących wzrost, apoptozę, przeżywalność komórek, adhezję i migrację. Jednocześnie enzymatyczna aktywność białka PTEN, jego stabilność, wewnątrzkomórkowa lokalizacja, jak i ekspresja genu także podlegają kompleksowej kontroli. Badania wielu tkanek rakowych wskazują, że obniżona biologiczna aktywność białka PTEN lub jej całkowity brak mogą być następstwem zaburzenia ekspresji genu *PTEN* w drodze mutacji i/lub zmian epigenetycznych (głównie zwiększenia metylacji regionu promotorowego genu). Wyjaśnienie biologicznej roli białka supresorowego PTEN i powiązanie jej z regulacją jego aktywności i aktywności genu staje się ważne w aspekcie poszukiwania farmakologicznych możliwości hamowania transformacji nowotworowej już we wczesnych etapach tego procesu.

**Słowa kluczowe:** białko supresorowe PTEN, gen *PTEN*, metylacja promotora *PTEN*.

**Summary:** The tumour suppressor protein PTEN (also called MMAC1 and TEP1) is a dual specificity phosphatase, recognizing both lipid and protein substrates. By its lipid phosphatase activity, PTEN dephosphorylates phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP-3), which leads to negative regulation of serine-threonine kinase Akt (PKB). By its protein phosphatase activity, PTEN participates in regulation of MAP kinase signalling pathway through dephosphorylation of FAK and Shc proteins. PTEN protein, with the lipid and protein phosphatase activity, contributes to modulation of two main intracellular signal transduction pathways: growth factors/PI3K/Akt and Shc/Ras/Raf/MAPK, involved in regu-

\*Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, temat własny nr 502-12-302.

lation of cell growth, apoptosis, viability, adhesion and cell migration. PTEN is a crucial protein for normal cell development. Simultaneously, enzymatic activity of PTEN, its stability, subcellular localization and gene expression are under tight control. Studies on many cancer tissues imply that a decrease of biological activity of PTEN or complete lack of its function may result from alteration of *PTEN* gene expression due to mutation and/or epigenetic modification (mainly hypermethylation of promoter region of the gene). The explanation of the biological role of PTEN tumour suppressor protein and relationship between the protein activity and gene expression has great significance in searching for pharmacological strategies of inhibition of carcinogenesis at early steps of the process.

*Key words:* tumour suppressor protein PTEN, *PTEN* gene, methylation of *PTEN* promoter.

## WSTĘP

Białko supresorowe PTEN (ang. *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten*), nazywane także MMAC1 (ang. *Mutated in Multiple Advanced Cancers 1*) lub TEP1 (ang. *TGF- $\beta$  regulated and Epithelial cell enriched Phosphatase 1*) należy do fosfataz o podwójnej substratowej lipidowo-białkowej specyficzności. Jako fosfataza lipidowa, PTEN defosforyluje fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP-3, ang. *Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), co prowadzi do negatywnej regulacji szlaku sygnałowego: czynniki wzrostu/PI3K (ang. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)/Akt (PKB, ang. *Protein Kinase B*) [5]. Jako fosfataza białek (zaliczana do białkowych fosfataz tyrozynowych ze zdolnością defosforylacji także seryny i treoniny), PTEN poprzez defosforylację kinazy białkowej FAK (ang. *Focal Adhesion Kinase*) i białka Shc uczestniczy w regulacji szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP (ang. *Mitogen-Activated Protein*) [22]. Białko PTEN wykazuje dużą homologię z tensyną, białkiem cytoszkieletu komórkowego i z auksyliną, białkiem zaangażowanym w transport pęcherzyków synaptycznych. Białko PTEN pełni istotną rolę w prawidłowym rozwoju zarodka [69] i w prawidłowym funkcjonowaniu komórek poprzez regulowanie podstawowych procesów komórkowych, w tym proliferacji, różnicowania, migracji oraz przeżywalności w wyniku kontroli cyklu komórkowego w punkcie przejścia G<sub>1</sub>/S [18,69].

Białko PTEN w komórce występuje w dwóch subfrakcjach, w cytoplazmie i jądrze komórkowym [29]. Cytoplazmatyczna lokalizacja białka jest ściśle związana z jego aktywnością wobec substratu lipidowego [2,12]. W komórkach nowotworowych białko PTEN wykrywane jest głównie w cytoplazmie, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, gdzie występuje głównie w jądrze [17,38,66].

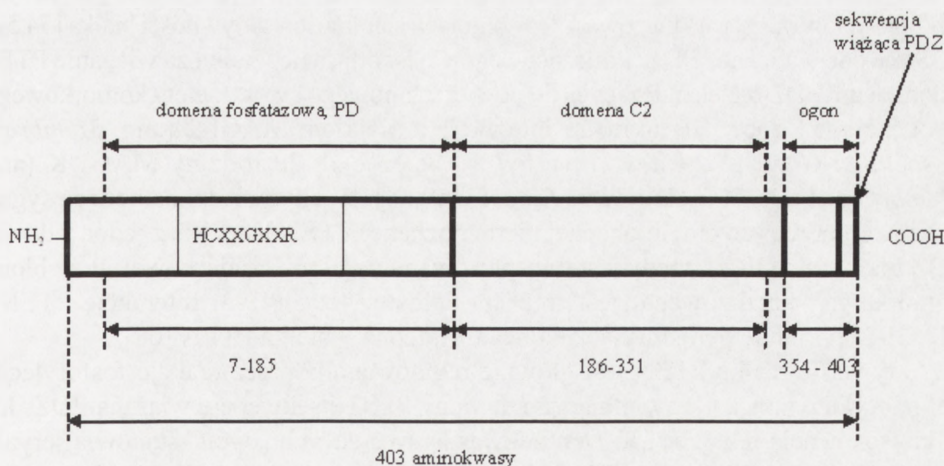
Białko PTEN zostało odkryte w roku 1997 po licznych doniesieniach o mutacjach i delecjach na chromosomie 10 w komórkach ludzkich glejaków złośliwych [42], w raku prostaty [4] i w raku błony śluzowej macicy [57]. Wyniki intensywnych prac badawczych nad rolą i właściwościami białka PTEN w komórkach tkanek rakowych przyczyniły się do zaliczenia go do kluczowych białek supresorowych przeciwdziałających procesowi kancerogenezy ze względu na antagonistyczne działanie wobec aktywności wielu kinaz białkowych promujących proliferację komórek.



W niniejszej pracy przeglądowej na temat właściwości białka PTEN i regulacji jego aktywności szczególną uwagę zwrócono na zaburzenia funkcji tego białka, obserwowane w wielu typach ludzkich nowotworów, zaburzenia będące wynikiem wyciszenia aktywności genu *PTEN* w drodze epigenetycznych zmian.

## BUDOWA BIAŁKA PTEN I REGULACJA JEGO AKTYWNOŚCI

PTEN jest białkiem o masie około 50 kDa, zbudowanym z 403 aminokwasów [2,18] (ryc. 1). Białko to może występować w dwóch subfrakcjach komórki: w cytoplazmie i jądrze komórkowym [29]; przy czym tylko niewielka ilość białka cytoplazmatycznego jest związana z błoną komórkową. Na podstawie badań zdrowych i rakowych komórek tarczycy wykazano (na podstawie immunohistochemicznego oznaczenia), że w komórkach prawidłowych PTEN znajduje się w przeważającej części w jądrze komórkowym i otoczce jądra oraz, w mniejszym stężeniu, w cytoplazmie [17,38]. Natomiast w komórkach rakowych tarczycy białko PTEN wykrywano głównie w cytosolu, przy czym ekspresja genu kodującego to białko była obniżona w obu frakcjach lub całkowicie wyciszona w jądrze [17]. Analogiczne spostrzeżenia na temat lokalizacji PTEN i poziomu ekspresji w cytosolu i jądrze dały wyniki badań komórek raka trzustki i prostaty [38,66]. Do chwili obecnej nie jest znany mechanizm przejścia białka PTEN z cytoplazmy do jądra, ponieważ białko to nie ma sygnału jądrowej lokalizacji (NLS, ang. *Nuclear Localization Signal*). Możliwe, że w translokacji białka z cytoplazmy do jądra bierze udział białko MDM2 (ang. *Murine Double Minute 2*) i ten transport może być zależny od fazy cyklu komórkowego, jak i może być odpowiedzią na podział i wzrost komórki [66]. Funkcjonalne regiony białka PTEN przedstawiono na rycinie 1.



RYCINA 1. Budowa białka PTEN (wg [59] zmienione)

Na końcu  $-NH_2$ , pomiędzy 7 i 185 aminokwasem znajduje się domena fosfatazowa (PD, ang. *Phosphatase Domain*) homologiczna do cytoszkieletowego białka tensyny. Domena ta zawiera sekwencję HCXXGXXRS/T charakterystyczną dla białkowych fosfataz tyrozynowych oraz fosfataz o podwójnej specyficzności [59]. W domenie fosfatazowej wokół tej sekwencji znajdują się zasadowe aminokwasy, co razem tworzy zwiększone centrum aktywne, zdolne do przyjęcia kwaśnych substratów – fosfoinozytoli [27]. Domena ta katalizuje defosforylację fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PIP-3), który jest substratem lipidowym dla PTEN [5,12,18]. Mutacyjna zmiana centrum aktywnego jest przyczyną braku aktywności fosfatazowej wobec substratu lipidowego, co jest ściśle związane z właściwościami supresorowymi PTEN wobec szlaku sygnałowego: czynniki wzrostu/PI3K/Akt, sprzyjającego przeżywalności i proliferacji komórek [34]. Spostrzeżenie to podkreśla ważność centrum aktywnego w domenie fosfatazowej dla aktywności wobec PIP-3, jak i ważność reakcji defosforylacji PIP-3 w kontroli prawidłowego rozwoju komórek. Środkowa domena białka PTEN, zwana domeną C2, znajduje się pomiędzy 186 i 351 aminokwasem, jest ona homologiem domeny obecnej w kinazie białkowej C. Domena C2 jest odpowiedzialna za wiązanie substratu lipidowego i właściwe jego zorientowanie w stosunku do domeny fosfatazowej oraz za wiązanie PTEN do błony komórkowej [16,68]. Przypuszcza się, że domena C2 odgrywa także rolę w zależnej od jonów  $Ca^{2+}$  interakcji z lipidami, choć prawdopodobnie nie wiąże bezpośrednio jonów  $Ca^{2+}$  [59]. Koniec  $-COOH$  łańcucha peptydowego PTEN (tzw. „ogon”, rozpoczynający się od 354 aminokwasu) ma dwie domeny PEST (ang. *proline (P), glutamate (E), serine (S), and threonine (T)*), pomiędzy 370 i 375 aminokwasem oraz 379 i 386 aminokwasem) i sekwencję konsensusową wiążącą domeny PDZ innych białek. Skrót domeny PDZ jest utworzony z pierwszych liter białek, w których po raz pierwszy zidentyfikowano tę domenę: PSD-95 (ang. *Post-Synaptic Density protein*); Dlg (ang. *Drosophila disco large protein*); ZO1 (ang. *Zonula Occludens 1 protein*). W drugiej domenie PEST znajdują się trzy potencjalne miejsca fosforylacji białka PTEN: seryna w pozycji 380 oraz treoniny w pozycji 382 i 383. Fosforylacja/defosforylacja tych aminokwasów odgrywa kluczową rolę w regulacji stabilności i aktywności białka [54,59].

Sekwencja wiążąca PDZ, kończąca „ogon” jest odpowiedzialna za wiązanie PTEN z domenami PDZ białek należących do powierzchniowego cytoszkieletu komórkowego; sekwencja ta odpowiada m.in. za interakcję z białkiem MAGI-2 (ang. *Membrane Associated Guanylate kinase Inverted 2*), należącym do rodziny MAGUK (ang. *Membrane-Associated Guanylate Kinase*) [59,68]. W odpowiedzi na bodźce sygnałowe w komórce (do chwili obecnej nierozpoznane) PTEN łączy się z jedną z domen PDZ białka MAGI-2 i wtedy jest transportowany do błony komórkowej. Przy błonie komórkowej katalizowana jest reakcja defosforylacji PIP-3. Interakcję PTEN z MAGI-2 stymuluje defosforylacja końca C („ogona”) białka PTEN [68].

Aktywność białka PTEN jest głównie regulowana poprzez reakcję fosforylacji i defosforylacji końca C zawierającego domeny PEST i sekwencję wiążącą PDZ. Jest to konsekwencją faktu, że 28% aminokwasów tworzących „ogon” stanowią seryna i treonina (aminokwasy z grupą OH, która może ulegać fosforylacji). Fosforylacja końca C wpływa także na stabilność białka PTEN, jak i moduluje interakcję z innymi białkami,



a bezpośrednio zmiany elektrostatyczne zmieniają zdolność wiązania PTEN do błony komórkowej [8]. Tolkacheva i wsp. w badaniach z komórkami 293T (są to komórki nerki płodu ludzkiego) i PC3 (są to komórki raka gruczołu krokowego) wykazali, że około 95% białka PTEN podlega fosforylacji i ta fosforylowana forma stanowi pulę stabilnego cytoplazmatycznego białka, lecz funkcjonalnie nieczynnego [54]. PTEN jest fosforylowany głównie przez kinazę kazeinową typu 2 (CK2, ang. *Casein Kinase 2*) i ta fosforylacja może być regulowana przez serynowo-treoninową kinazę Akt w drodze: (i) kontrolowania przez Akt niezidentyfikowanej fosfatazy oddziałującej na PTEN lub (ii) inicjowania przez Akt zmian w PTEN, które skutkują mniejszym powinowactwem do CK2 [12,55]. Regulacja ta stanowi przypuszczalny mechanizm negatywnej wzajemnej zależności pomiędzy szlakiem PI3K/Akt a aktywnością PTEN [18,55].

Defosforylacja PTEN na końcu C z jednoczesnym wzrostem aktywności tego białka, związana jest z interakcją z białkiem MAGI-2 i z przesunięciem białka PTEN, będącego w kompleksie z MAGI-2, w kierunku błony komórkowej oraz z reakcją defosforylacji PIP-3. Uwolnienie PTEN (w niefosforylowanej formie) z kompleksu z MAGI-2 umożliwia jego degradację w proteasomach, prawdopodobnie przez szlak ubikwityna-proteasomy [68]. Ta degradacja może być zahamowana przez białko BMP2 (ang. *Bone Morphogenetic Protein 2*), należące do rodziny transformujących czynników wzrostu beta (TGF- $\beta$ , ang. *Transforming Growth Factor  $\beta$* ), co wykazano na przykładzie komórek linii MCF-7 [62]. Białko BMP2 osłabia wiązanie PTEN z enzymami sprzężonymi z ubikwitynami, przyczyniając się do wzrostu stężenia PTEN poprzez zmniejszenie jego degradacji [62]. Białko PTEN może być także degradowane przez kaspazę 3, jedną z kluczowych proteaz w czasie apoptozy. Kaspaza 3 rozpoznaje cztery miejsca aminokwasowe (pozycje 301, 371, 375, 384), ale tylko w niefosforylowanej formie białka PTEN [56].

Fosforylacja i aktywność PTEN są także zależne od stężeń hormonów steroidowych, estrogenu i progesteronu, co wykazały badania stanu fosforylacji PTEN w komórkach błony śluzowej macicy w cyklu miesięczkowym i we wczesnym okresie ciąży [33]. W fazie proliferacyjnej cyklu miesięczkowego w obecności estrogenu obserwowano wzrost fosforylacji „ogona” i w konsekwencji spadek aktywności PTEN. W fazie sekrecyjnej cyklu i we wczesnym okresie ciąży w obecności progesteronu odnotowywano wzrost stężenia niefosforylowanego aktywnego PTEN w cytoplazmie. Spadek aktywności białka PTEN w fazie proliferacyjnej może przyczyniać się do zwiększenia przeżywalności komórek na skutek odblokowania pro-proliferacyjnego szlaku sygnałowego PI3K/Akt, co tłumaczy ogólnie małą liczbę komórek apoptotycznych w błonie śluzowej macicy w tej fazie. Wzrost aktywności PTEN w fazie sekrecyjnej i we wczesnym okresie ciąży może z kolei wyjaśniać zwiększenie liczby komórek apoptotycznych, co może być związane z hamowaniem szlaku PI3K/Akt przez PTEN [23,33]. Zatem PTEN może być jednym z białek regulatorowych, poprzez które estrogen i progesteron wpływają na proliferację i apoptozę komórek błony śluzowej macicy. Ponadto w komórkach błony śluzowej macicy obserwowano korelację pomiędzy zmianą lokalizacji PTEN i fazą cyklu miesięczkowego [23].

Ostatnie doniesienia naukowe sugerują, że także fitoestrogeny (np. resweratrol) mogą mieć wpływ na regulację aktywności fosfatazowej PTEN wobec substratu lipidowego [63]. W komórkach raka piersi MCF-7 po hodowli z fitoestrogenami obserwowano zwiększenie poziomu białka PTEN, wzrost stężenia niefosforylowanej kinazy Akt i wzrost stężenia białka p27. Natomiast nie stwierdzano wpływu resweratrolu na aktywność fosfatazową PTEN wobec substratów białkowych, czego dowodem były pozostające bez zmian: poziom cykliny D1 i aktywność szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP. Autorzy prac sugerują, że ujawnienie właściwości fosfatazowych PTEN wobec substratów białkowych prawdopodobnie wymaga wyższych stężeń PTEN niż wobec substratu lipidowego lub że fitoestrogeny powodują zmiany konformacyjne w białku PTEN, mające wpływ na jego zdolność do wiązania się z substratami białkowymi [63].

## ROLA BIAŁKA PTEN W PRAWIDŁOWYM ROZWOJU KOMÓREK

PTEN poprzez swoje lipidowo-białkowe właściwości fosfatazowe bierze udział w regulacji podstawowych etapów rozwoju komórki i jej funkcji (ryc. 2). I tak, do najważniejszych funkcji białka należy udział w regulacji równowagi pomiędzy proliferacją a apoptozą poprzez działanie fosfatazowe zarówno wobec lipidowego substratu, jakim jest PIP-3, jak i substratów białkowych, tj. kinazy FAK i białka Shc. Aktywność fosfatazowa PTEN wpływa pośrednio na wzrost, adhezję i migrację komórek, jak i na regulację przeżywalności komórek poprzez: indukowanie zatrzymania cyklu komórkowego w fazie  $G_1$  (co daje czas na naprawę uszkodzeń DNA), indukowanie apoptozy (gdy naprawa uszkodzeń DNA nie jest możliwa) lub anoikis (proces indukcji apoptozy w komórkach po utracie kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową, stanowiący fundamentalną cechę zdrowych komórek nabłonkowych i pozwalający na ich wymianę) [69].

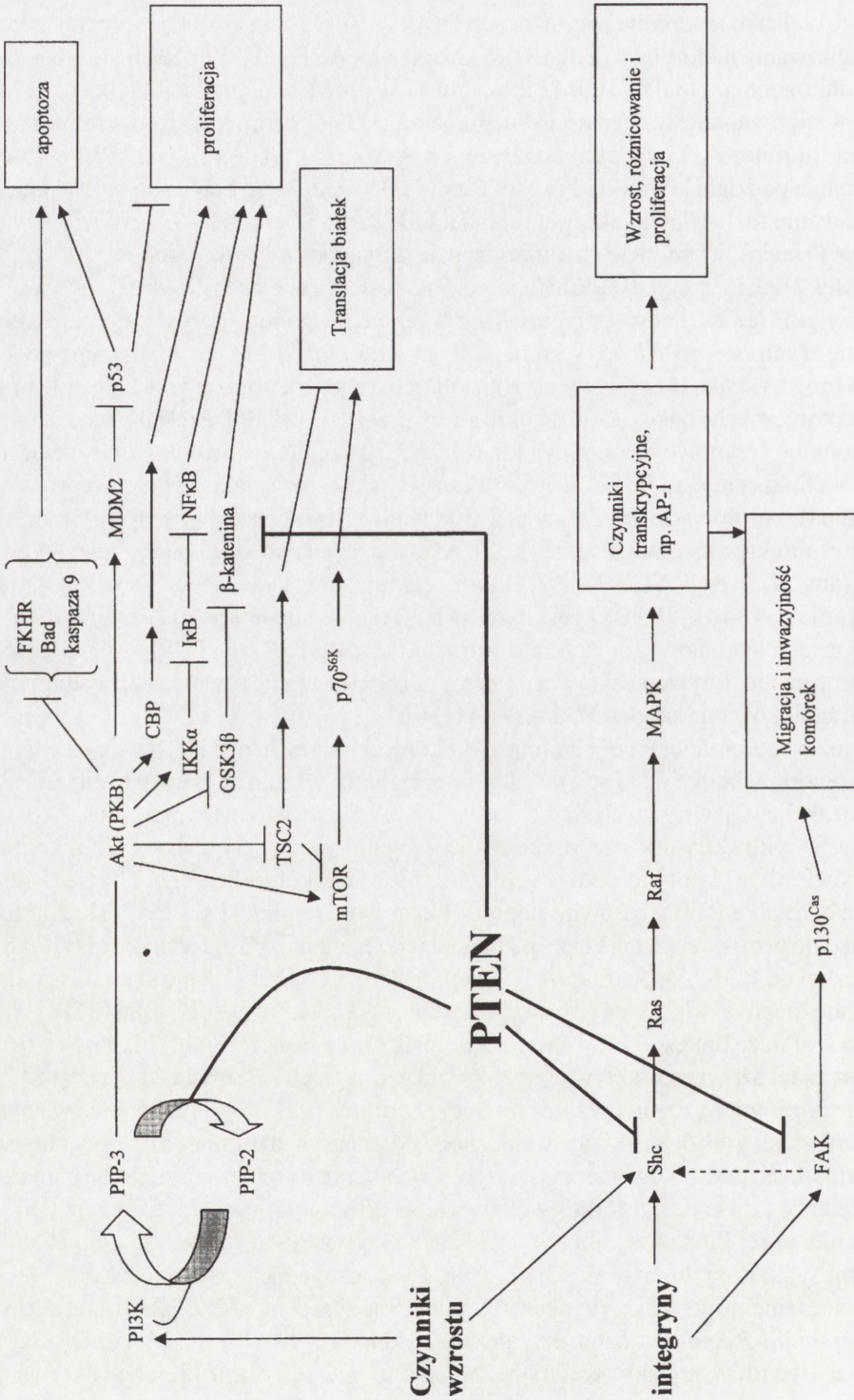
Jako fosfataza lipidowa, PTEN defosforyluje PIP-3, wtórny przekaźnik sygnału w komórce (ryc. 2), tym samym uniemożliwia działanie białka Akt, którego aktywacja i transport do błony komórkowej wymagają obecności PIP-3 i odpowiednich kinaz [13]. PIP-3 powstaje (w pobliżu błony komórkowej) w wyniku fosforylacji fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP-2, ang. *Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate*) przez kinazę PI3 (3-kinazę fosfatydyloinozytolu). Kinaza PI3 może być aktywowana albo przez kinazy tyrozynowe receptorowe (RTK, ang. *Receptor Tyrosine Kinase*), albo przez receptory sprzężone z białkiem G (GPCR, ang. *G-Protein-Coupled Receptors*) [36]. Konsekwencją zablokowania aktywacji Akt jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie  $G_1$  (czemu towarzyszy wzrost stężenia białka p27) i indukowanie apoptozy poprzez zahamowanie antyapoptotycznych, jak i odblokowanie proapoptotycznych szlaków przekazu sygnału [5,7,12,41,51]. Brak aktywacji kinazy Akt prowadzi do szeregu wymienionych poniżej zmian. Następuje aktywacja czynnika transkrypcyjnego FKHR (ang. *Forkhead Homologue in Rhabdomyosarcoma*), należącego do rodziny czynni-



ków transkrypcyjnych Forkhead, który w formie niefosforylowanej aktywuje geny kodujące białka proapoptyczne, takie jak: FasL, IGBP-1 i Bim [35]. Poza tym dochodzi do zahamowania fosforylacji białka MDM2 ze szlaku ARF/MDM2/p53 (fosforylowana forma onkogenego białka MDM2 uczestniczy w procesie degradacji białka p53) i w konsekwencji zahamowana zostaje degradacja p53, a to prowadzi poprzez wzrost stężenia inhibitorów kinaz cyklinozależnych w komórce (tzn. p21, p27 [50,67]) do zatrzymania podziału komórki i/lub apoptozy [31,36]. Skutkiem braku aktywnej Akt jest zahamowanie fosforylacji i aktywacji białka CBP (ang. *Cyclic AMP-response element Binding Protein*), które zwiększa transkrypcję antyapoptycznych genów, takich jak *Bcl-2*, *Mcl-1*, jak i samego *Akt* [36]. Zahamowana zostaje również fosforylacja i aktywacja  $\alpha$  kinazy I $\kappa$ B (IKK $\alpha$ , ang. *I $\kappa$ appaB Kinase  $\alpha$* ), co powoduje wzrost stężenia białka I $\kappa$ B (ang. *Inhibitor of NF- $\kappa$ B*), które jest inhibitorem czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (ang. *Nuclear Factor kappa B*); skutkiem tego jest obniżenie ekspresji genów antyapoptycznych i onkogenów regulowanych przez NF- $\kappa$ B [36]. Brak aktywnej kinazy Akt aktywuje serynowo-treoninową kinazę GSK3 $\beta$  (ang. *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* ), która fosforyluje, m.in.  $\beta$ -kateninę (kluczowy składnik szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina), co prowadzi do degradacji  $\beta$ -kateniny i osłabienia jej wpływu, m.in. na indukowanie ekspresji onkogenów [40,53]. Aktywacji ulega również białko supresorowe TSC2 (ang. *Tuberous Sclerosis 2*), które reguluje translację wielu genów poprzez hamowanie serynowo-treoninowej kinazy mTOR (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*) ze szlaku sygnałowego: czynniki wzrostu/RTK/PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K</sup> [25,36]. Zahamowanie fosforylacji i aktywacji kinazy mTOR następuje również bezpośrednio w wyniku zablokowania aktywacji kinazy Akt [36].

Jak już wspomniano, PTEN hamuje cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub>. Towarzyszy temu wzrost poziomu białka p27 i spadek aktywności kinaz cyklinozależnych (m.in. kinazy cyklinozależnej 2), wiążących się z cyklinami E i A, kontrolującymi przejście z fazy G<sub>1</sub> do fazy S cyklu komórkowego [28,64,65]. Weng i wsp. [64,65] w badaniach na komórkach MCF-7 potwierdzili, że zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub> jest zależne od białka PTEN zarówno poprzez negatywną regulację szlaku PI3K/Akt (co prowadzi do wzrostu stężenia białka p27 i późniejszej apoptozy komórek), jak i w drodze niezależnej od PI3K/Akt, a mianowicie poprzez negatywną regulację szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP (co powoduje spadek aktywności cykliny D1).

Jako fosfataza białek, PTEN, poprzez defosforylację kinazy FAK i białka Shc (oba białka są zaangażowane w aktywację dróg przekazu sygnału zależnych od kinazy MAP), reguluje proliferację, różnicowanie i migrację komórek [22] (ryc. 2). FAK jest ważnym białkiem szlaku transdukcji sygnału zależnego od integrzyn, natomiast Shc – od integrzyn i epidermalnych czynników wzrostu. Aktywacja integrzyn (poprzez wiązanie się komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej) prowadzi do zwiększenia fosforylacji FAK i wzmocnienia jej kinazowej aktywności [20]. Aktywna FAK wiąże się z kinazami i białkami sygnałowymi, w tym z Grb2, c-Src i Shc, czego następstwem jest aktywacja dalszych elementów szlaku przekazu sygnału Shc/Ras/Raf/MEK/ERK (ang. *Extra-cellular signal-Regulated Kinase*), zależnego od kinazy MAP [45,52] (ryc. 2). Szlak ten może być również uaktywniony bezpośrednio przez fosforylację Shc i aktywację



RYCINA 2. Model działania białka supresorowego PTEN

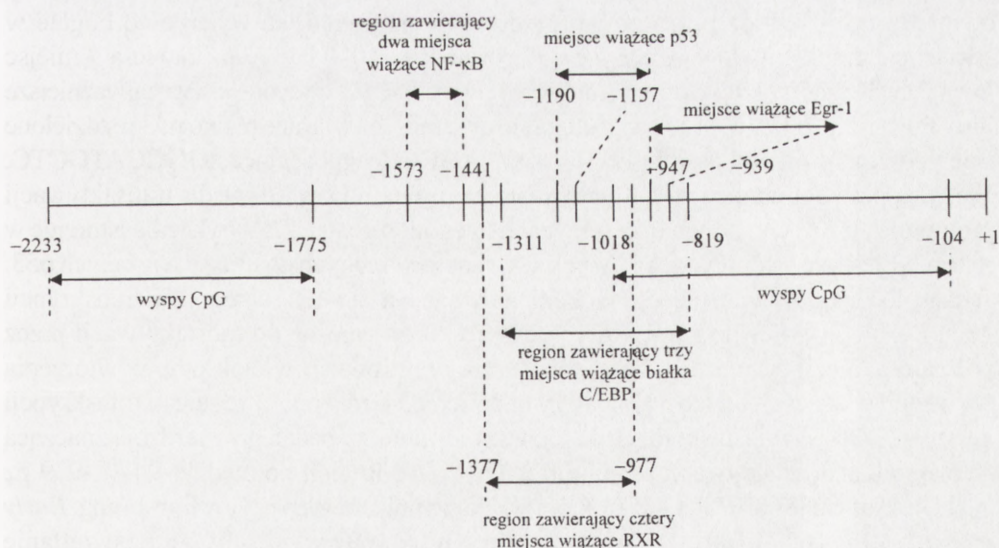


Ras pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych. Aktywne fosforylowane białko Shc wiąże się z kompleksem Grb2-Sos przy błonie komórkowej. Szlak Shc/Ras/Raf/MEK/ERK moduluje wzrost, przeżywalność i inwazyjność komórek poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych regulujących transkrypcję genów, pobudzających proliferację komórek i/lub zapobiegających ich apoptozie [14,21]. Jednym z aktywowanych czynników jest kompleks transkrypcyjny AP-1 (ang. *Activator Protein 1*), w skład którego wchodzi białko JUN [2,14].

PTEN, defosforylując FAK i Shc, wpływa na migrację i inwazyjność komórek nie tylko poprzez pośrednie blokowanie szlaku zależnego od kinazy MAP, ale również poprzez blokowanie szlaku FAK/p130<sup>Cas</sup> (ang. *p130 Crk-associated substrate*) [21,52].

Interesujący jest fakt, że główne miejsce fosforylacji kinazy FAK (tyrozyna w pozycji 397) jest jednocześnie miejscem wiązania nie tylko białka c-Src, ale również kinazy PI3. Kinaza PI3 wiąże się z FAK pod wpływem stymulacji za pośrednictwem czynników wzrostu lub adhezji komórek i może odgrywać ważną (inicjującą) rolę w funkcjonowaniu FAK [43].

Ostatnie wyniki badań wskazują, że PTEN może regulować adhezję i migrację komórek poprzez bezpośrednią defosforylację  $\beta$ -kateniny, co wpływa na utrzymanie kompleksu adhezyjnego E-kadheryna/kateniny z cytoszkieletem aktynowym [61]. Związanie białka PTEN z  $\beta$ -kateniną i jej defosforylacja zwiększa zdolności adhezyjne komórek. Uwolnienie PTEN od  $\beta$ -kateniny pod wpływem TGF- $\beta$  umożliwia wiązanie  $\beta$ -kateniny z kinazą PI3 i jej fosforylację przez tę kinazę. Te zmiany w kompleksie adhezyjnym E-kadheryna/kateniny skutkują oderwaniem kompleksu od cytoszkieletu aktynowego i wzrostem migracji komórek [61]. Regulacja adhezji poprzez wiązanie



RYCINA 3. Budowa promotora genu *PTEN*

$\beta$ -kateniny z białkiem PTEN lub kinazą PI3 jest kolejnym dowodem potwierdzającym antagonistyczny charakter PTEN w stosunku do kinazy PI3.

Wpływ białka PTEN na regulację działania PIP-3, wtórnego przekaźnika sygnału w komórce, odgrywa istotną rolę w kontroli wielkości komórek nerwowych (prawdopodobnie na poziomie translacji białek) [1] oraz w kontroli wielkości i kurczliwości mięśnia sercowego [6]. Istotną rolę w regulowaniu przez PTEN wielkości kardiomiocytów pełni droga sygnałowa: receptor kinazy tyrozynowej p110 $\alpha$  / PTEN [6]. W przypadku kontroli kurczliwości mięśnia sercowego działanie PTEN jest antagonistyczne wobec kinazy  $\gamma$ PI3 (izoforny kinazy PI3), białka, które po aktywacji przez wiązanie się z białkiem G, prowadzi do zahamowania syntezy cAMP, co skutkuje obniżeniem kurczliwości mięśnia sercowego [6,18].

## BUDOWA I REGULACJA AKTYWNOŚCI PROMOTORA GENU *PTEN*

Gen *PTEN/MMAC1/TEP1* zlokalizowany jest na chromosomie 10q23.3. i zawiera 9 eksonów. W regionie promotorowym genu, pomiędzy -2233 a +1 pz [49] znajdują się: (i) liczne sekwencje CpG, (ii) miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne: Egr-1, NF- $\kappa$ B, p53, RXR i CREB, (iii) potencjalne miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne: AP-2, AP-4, E2F i Sp1 [19,44]. Promotor genu *PTEN* nie zawiera sekwencji konsensusowej TATA.

W promotorze genu *PTEN* zidentyfikowano wiele ważnych regionów (ryc. 3). Regiony od -2233 do -1775 pz [49] i od -1018 do -104 pz [19,44] są wyjątkowo bogate w sekwencję dinukleotydom CpG. Region pomiędzy -1040 i -817 pz zawiera 9 miejsc inicjujących transkrypcję, z których miejsce w pozycji -1031 uważane jest za najważniejsze [46]. Pomiędzy -1190 i -1157 pz znajdują się dwa miejsca wiążące białko p53 rozdzielone (nietypowo) 14 parami zasad [49]: GAGCAAGCCCcaggcagctactGGGCATGCTC. Według opinii Stambolic i wsp. [49] te miejsca wiążące p53 są istotne dla transaktywacji promotora *PTEN*, chociaż analiza sekwencji ludzkiego genu *PTEN* wykazała istnienie w intronie 1 jeszcze siedmiu dodatkowych sekwencji podobnych do miejsc wiążących p53. Jednak do chwili obecnej nie jest udokumentowana ich istotność w regulacji transkrypcji genu *PTEN* [46]. Pewne geny, których ekspresja jest zależna od transaktywacji przez p53, np. p21 czy cyklina G1, zawierają (także w intronach) wielokrotne powtórzenia sekwencji wiążących białko p53. Należy nadmienić, że rola p53 w regulacji transkrypcji genu *PTEN* jest ciągle dyskutowana i nie wszyscy autorzy badań potwierdzają znaczącą rolę tego białka w aktywacji promotora *PTEN* [46]. Region pomiędzy -947 i -939 pz zawiera sekwencję GCGGCGGCG, która wiąże czynnik transkrypcyjny Egr-1 (ang. *Early growth response 1*) [60]. Badania Virolle i wsp. [60] wykazały, że naświetlanie promieniami UV komórek linii 293T i linii NMuMG (są to prawidłowe nabłonkowe komórki gruczołów mlecznych) stymuluje syntezę endogennego Egr-1 i w konsekwencji ekspresję *PTEN* na poziomie mRNA i białka. Ważność miejsca wiążącego czynnik transkrypcyjny



Egr-1 dla ekspresji *PTEN* podkreślają badania, w których delekcja miejsca wiążącego Egr-1 w promotorze *PTEN* indukowała oporność komórek linii nowotworowych (293T) na naświetlanie promieniami UV. Konsekwencją tego było zmniejszenie lub zahamowanie apoptozy komórek [60]. W regionie pomiędzy -1573 i -1441 pz znajdują się dwa potencjalne miejsca wiążące NF- $\kappa$ B: GGAATCTCT (w pozycji od -1573 do -1565 pz) i GGGTATTCCC (w pozycji od -1450 do -1441 pz) [58], przy czym badania Vasudevan i wsp. [58] wykazały, że mechanizm inhibicji transkrypcji genu *PTEN* przez NF- $\kappa$ B jest niezależny od tych miejsc. Podjednostka czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, białko p65, hamuje aktywność promotora genu *PTEN* w drodze bezpośredniego współzawodnictwa z innymi czynnikami transkrypcyjnymi o wiązanie koaktywatorów transkrypcji, CBP i p300. Wiążąc CBP/p300, białko p65 ogranicza pulę koaktywatorów transkrypcji dla innych czynników transkrypcyjnych, które mogą być zaangażowane w pobudzanie ekspresji genu *PTEN*. Badania ludzkich komórek raka płuc i tarczycy wykazały, że podwyższony poziom białka p65 wiąże się z obniżoną ekspresją *PTEN* [58]. Promotor genu *PTEN* pomiędzy -1311 i -819 pz zawiera trzy miejsca dla białek wiążących się z sekwencją CCAAT (C/EBP, ang. *CCAAT/Enhancer-Binding Protein*) oraz pomiędzy -1377 i -977 pz cztery miejsca wiążące receptor kwasu retinowego RXR [58]. Ponadto badania komórek linii Caco2 (komórki rakowe jelita grubego) i komórek linii MCF-7 wykazały, że ekspresja genu *PTEN* na poziomie mRNA była stymulowana przez receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów typu gamma (PPAR $\gamma$ , ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$* ), aktywowane selektywnym ligandem, chociaż miejsca wiążące PPAR $\gamma$ : GGGACCAAGGTCA oraz GGGATAAAGGGCA, znajdują się w odległości około 11 000 pz w górę od promotora genu *PTEN*. Stymulacja transkrypcji *PTEN* przez PPAR $\gamma$  korelowała ze spadkiem aktywności kinazy PI3 i ze spadkiem fosforylacji białka Akt [37].

## ZMIANY EPIGENETYCZNE GENU *PTEN* W LUDZKICH KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Zaburzenia ekspresji genu *PTEN* na skutek genetycznych i epigenetycznych zmian zostały stwierdzone w wielu dziedzicznych i sporadycznych nowotworach ludzkich. Mutacje dziedziczne genu w komórkach zarodkowych występują w wielu zespołach chorobowych [24,30,71], są odpowiedzialne m.in. za zespoły chorobowe Cowdena i Bannayan-Zonana [30]. W wielu sporadycznych nowotworach obserwowano brak lub znaczne obniżenie stężenia białka PTEN, co związane było nie tylko ze zmianami genetycznymi, ale również z epigenetycznymi, głównie ze zwiększoną metylacją sekwencji dinukleotydowych CpG w regionie promotorowym genu [26,72]. Związek przyczynowy między zwiększoną metylacją promotora genu *PTEN* a wyciszeniem ekspresji odnotowywano w: raku błony śluzowej macicy [32,44], raku prostaty [10], raku żołądka [26], sporadycznym raku okrężnicy [19], raku niedrobnokomórkowym płuc (NSCLC, ang. *Non-Small Cell Lung Cancer*) [47], czerniaku [48,70], sporadycznym raku piersi [11,15,39].

Salvesen i wsp. [44] oceniają, że 19% przypadków raka błony śluzowej macicy charakteryzuje zwiększona metylacja w regionie promotorowym genu *PTEN*. Ponadto te przypadki raka wykazywały korelację pomiędzy metylacją promotora genu i tworzeniem przerzutów (metastazą) oraz mikrosatelitarną niestabilnością. Podobną zależność obserwowano w sporadycznym raku okrężnicy; w grupie przypadków z wysokim stopniem mikrosatelitarnej niestabilności w 19% wykazano metylację regionu regulatorowego genu [19]. Udziału metylacji w wyciszeniu transkrypcji *PTEN* nie wykluczono także w raku prostaty [10]. Również wyniki badań Kanga i wsp. [26] wykazały zmiany we wzorze metylacji promotora genu *PTEN* w 39% przypadków raka żołądka i utratę ekspresji genu w 73% tych przypadków. Również w raku płuc NSCLC brak białka PTEN może być, w części przypadków, wynikiem zmiany wzoru metylacji w regionie regulatorowym genu *PTEN*, ze względu na rzadkość odnotowywania mutacji w tym genie. Zwiększoną metylację promotora *PTEN* wykrywano w 35% przypadków raka płuc NSCLC i w 69% komórek linii tego raka płuc [47]. Utratę funkcjonalnego białka PTEN obserwowano także w 40–50% przypadków czerniaka [48], przy czym mutacje lub delecje w genie *PTEN* stwierdzano w 60% komórek linii czerniaka, ale tylko w 10% tkanek pobranych od pacjentów z tym nowotworem. Może to wskazywać, że w czerniaku inaktywacja genu w wyniku zmian epigenetycznych (tj. zwiększonej metylacji) albo zaburzenia subkomórkowej lokalizacji białka PTEN może odgrywać ważniejszą rolę niż mutacje [48,70]. W przypadku raka piersi brak (lub zmniejszenie) ekspresji *PTEN* obserwowano w około 33% przypadków i ta dysfunkcja genu korelowała z tworzeniem przerzutów do węzłów chłonnych, brakiem receptora estrogenowego i wysoką śmiertelnością [11,39].

Powyżej przytoczone wyniki badań sugerują, że w wielu typach nowotworów metylacja wysp CpG w regionie regulatorowym genu *PTEN* (jak i innych genów supresorowych lub genów metabolizmu podstawowego) może istotnie wpływać na wyciszenie jego (ich) transkrypcji, a to wyciszenie jest zależne od aktywności i ekspresji metylotransferazy DNA (*DNMT1*). Jest bardzo prawdopodobne, że pomiędzy aktywnością białka PTEN a ekspresją *DNMT1* istnieje ścisła zależność. Brak aktywnego białka PTEN prowadzi do odblokowania wewnątrzkomórkowego szlaku przekazu sygnału zależnego od kinazy MAP, którego ostatnim elementem jest białko JUN, będące składnikiem kompleksu AP-1 [3,9]. A białko JUN aktywuje aż trzy miejsca inicjujące transkrypcję (P2-P4) w genie *DNMT1*. Zwiększenie ekspresji tego genu może prowadzić do wzmożonej aktywności *DNMT1* i związanej z tym wzmożonej metylacji genów supresorowych (w tym także genu *PTEN*), skutkującej ich wyciszeniem na poziomie transkrypcji. Może to być jeden z mechanizmów progresji procesu kancerogenezy.

## PODSUMOWANIE

Przedstawiona charakterystyka białka PTEN oraz mechanizm regulacji jego aktywności, jak i aktywności genu *PTEN* w komórkach prawidłowych i nowotworowych podkreślają ważność roli, jaką pełni to białko w utrzymaniu prawidłowych funkcji



życiowych komórki i w hamowaniu procesu kancerogenezy poprzez utrzymanie właściwej proporcji pomiędzy proliferacją i apoptozą.

Na szczególną uwagę zasługują: antagonistyczny charakter fosfatazy PTEN wobec kinazy PI3 oraz regulacja ekspresji genu *PTEN* poprzez epigenetyczne wyciszenie jego transkrypcji. Wyjaśnienie biologicznej roli białka supresorowego PTEN i powiązanie jej z regulacją jego aktywności i aktywności genu staje się ważne w aspekcie poszukiwania farmakologicznych możliwości hamowania transformacji nowotworowej już w wczesnych etapach tego procesu.

## LITERATURA

- [1] BACKMAN S, STAMBOLIC V, MAK T. PTEN function in mammalian cell size regulation. *Curr Opin Neurobiol* 2002; **12**: 516–522.
- [2] BESSON A, ROBBINS SM, YONG VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 605–611.
- [3] BIGEY P, RAMCHANDANI S, THEBERGE J, ARAUJO FD, SZYF M. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase (*dnmt1*) gene. *Gene* 2000; **242**: 407–418.
- [4] CAIRNS P, OKAMI K, HALACHMI S, HALACHMI N, ESTELLER M, HERMAN JG, JEN J, ISAACS WB, BOVA GS, SIDRANSKY D. Frequent inactivation of PTEN/ MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 1997; **57**: 4997–5000.
- [5] CANTLEY LC, NEEL BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4240–4245.
- [6] CRACKOWER MA, OUDIT GY, KOZIERADZKI I, SARAOR R, SUN H, SASAKI T, HIRSCH E, SUZUKI A, SHIOI T, IRIE-SASAKI J, SAH R, CHENG H-YM, RYBIN VO, LEMBO G, FRATTA L, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ, BENOVIC JL, KAHN CR, IZUMO S, STEINBERG SF, WYMAN MP, BACK XPH, PENNINGER JM. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 2002; **110**: 737–749.
- [7] DAHIA PLM, AGUIAR RCT, ALBERTA J, KUM JB, CARON S, SILL H, MARSH DJ, RITZ J, FREDMAN A, STILES C, ENG C. *PTEN* is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 185–193.
- [8] DAS S, DIXON JE, CHO W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 7491–7496.
- [9] DENG C, YANG J, SCOTT J, HANASH S, RICHARDSON BC. Role of the ras-MAPK signaling pathway in the DNA methyltransferase response to DNA hypomethylation. *Biol Chem* 1998; **379**: 1113–1120.
- [10] DEOCAMPO ND, HUANG H, TINDALL DJ. The role of PTEN in the progression and survival of prostate cancer. *Minerva Endocrinol* 2003; **28**: 145–153.
- [11] DEPOWSKI PL, ROSENTHAL SI, ROSS JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001; **14**: 672–676.
- [12] DI CRISTOFANO A, PANDOLFI PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000; **100**: 387–390.
- [13] DOWNWARD J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 262–267.
- [14] FANG JY, RICHARDSON BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; **6**: 322–327.
- [15] GARCIA JM, SILVA J, PENNA C, GARCIA V, RODRIGUEZ R, CRUZ MA, CANTOS B, PROVENCIO M, ESPANA P, BONILLA F. Promoter methylation of the *PTEN* gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **41**: 117–124.
- [16] GEORGESCU M-M, KIRSCH KH, KALOUDIS P, YANG H, PAVLETICH NP, HANAFUSA H. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* 2000; **60**: 7033–7038.

- [17] GIMM O, PERREN A, WENG L-P, MARSH DJ, YEH JJ, ZIEBOLD U, GIL E, HINZE R, DELBRIDGE L, LEES JA, MUTTER GL, ROBINSON BG, KOMMINOTH P, DRALLE H, ENG C. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1693–1700.
- [18] GOBERDHAN DCI, WILSON C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: R239–R248.
- [19] GOEL A, ARNOLD CN, NIEDZWIECKI D, CARETHERS JM, DOWELL JM, WASSERMAN L, COMPTON C, MAYER RJ, BERTAGNOLLI MM, BOLAND CR. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 2004; **64**: 3014–3021.
- [20] GUAN JL. Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol* 1997; **16**: 195–200.
- [21] GU J, TAMURA M, PANKOV R, DANEN EHJ, TAKINO T, MATSUMOTO K, YAMADA KM. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 1999; **146**: 389–404.
- [22] GU J, TAMURA M, YAMADA KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 1998; **143**: 1375–1383.
- [23] GUZELOGLU-KAYISLIO, KAYISLI UA, AL-REJJAL R, ZHENG W, LULECI G, ARICI A. Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *J Clin Endocr Metab* 2003; **88**: 5017–5026.
- [24] IIDA S, TANAKA Y, FUJII H, HAYASHI S, KIMURA M, NAGAREDA T, MORIWAKI K. A heterozygous frameshift mutation of the PTEN/MMAC1 gene in a patient with Lhermitte-Duclos disease – only the mutated allele was expressed in the cerebellar tumor. *Int J Mol Med* 1998; **1**: 925–929.
- [25] INOKI K, LI Y, ZHU T, WU J, GUAN K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 648–657.
- [26] KANG Y-H, LEE HS, KIM WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; **82**: 285–291.
- [27] LEE JO, YANG H, GEORGESCU M-M, DI CRISTOFANO A, MAEHAMA T, SHI Y, DIXON JE, PANDOLFI P, PAVLETICH NP. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999; **99**: 323–334.
- [28] LI D-M, SUN H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G<sub>1</sub> cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15406–15411.
- [29] LI D-M, SUN H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; **57**: 2124–2129.
- [30] MARSH DJ, COULON V, LUNETTA KL, ROCCA-SERRA P, DAHIA PL, ZHENG Z, LIAW D, CARON S, DUBOUE B, LIN AY, RICHARDSON AL, BONNETBLANC JM, BRESSIEUX JM, CABARROT-MOREAU A, CHOMPRET A, DEMANGE L, EELES RA, YAHANDA AM, FEARON ER, FRICKER JP, GORLIN RJ, HODGSON SV, HUSON S, LACOMBE D, ENG C. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 507–515.
- [31] MAYO LD, DIXON JE, DURDEN DL, TONKS NK, DONNER DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5484–5489.
- [32] MUTTER GL, LIN M-C, FITZGERALD JT, KUM JB, BAAK JPA, LEES JA, WENG L-P, ENG C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 924–930.
- [33] MUTTER GL, LIN M-C, FITZGERALD JT, KUM JB, ENG C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 2000; **85**: 2334–2338.
- [34] MYERS MP, PASS I, BATTY IH, VAN DER KAAY J, STOLAROV JP, HEMMINGS BA, WIGLER MH, DOWNES CP, TONKS NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13513–13518.
- [35] NAKAMURA N, RAMASWAMY S, VAZQUEZ F, SIGNORETTI S, LODA M, SELLERS WR. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 8969–8982.
- [36] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 2004; **9**: 667–676.



- [37] PATEL L, PASS I, COXON P, DOWNES CP, SMITH SA, MACPHEE CH. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR $\gamma$  agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol* 2001; **11**: 764–768.
- [38] PERREN A, KOMMINOTH P, SAREMASLANI P, MATTER C, FEURER S, LEES JA, HEITZ PU, ENG C. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1097–1103.
- [39] PERREN A, WENG L-P, BOAG AH, ZIEBOLD U, THAKORE K, DAHIA PLM, KOMMINOTH P, LEES JA, MULLIGAN LM, MUTTER GL, ENG C. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1999; **155**: 1253–1260.
- [40] POLAKIS P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; **14**: 1837–1851.
- [41] RADU A, NEUBAUER V, AKAGI T, HANAFUSA H, GEORGESCU M-M. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 6139–6149.
- [42] RASHEED BK, McLENDON RE, FRIEDMAN HS, FRIEDMAN AH, FUCHS HE, BIGNER DD, BIGNER SH. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 1995; **10**: 2243–2246.
- [43] REISKE HR, KAO S-C, CARY LA, GUAN J-L, LAI J-F, CHEN H-C. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem* 1999; **274**: 12361–12366.
- [44] SALVESEN HB, MacDONALD N, RYAN A, JACOBS IJ, LYNCH ED, AKSLEN LA, DAS S. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2001; **91**: 22–26.
- [45] SCHLAEPFER DD, HUNTER T. Focal adhesion kinase overexpression enhances Ras-dependent integrin signaling to ERK2/Mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13189–13195.
- [46] SHENG X, KOUL D, LIU JL, LIU TJ, YUNG WK. Promoter analysis of tumor suppressor gene PTEN: identification of minimum promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **292**: 422–426.
- [47] SORIA J-C, LEE H-Y, LEE JI, WANG L, ISSA J-P, KEMP BL, LIU DD, KURIE JM, MAO L, KHURI FR. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1178–1184.
- [48] STAHL JM, CHEUNG M, SHARMA A, TRIVEDI NR, SHANMUGAM S, ROBERTSON GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 2881–2890.
- [49] STAMBOLIC V, MacPHERSON D, SAS D, LIN Y, SNOW B, JANG Y, BENCHIMOL S, MAK TW. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001; **8**: 317–325.
- [50] SU JD, MAYO LD, DONNER DB, DURDEN DL. PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment. *Cancer Res* 2003; **63**: 3585–3592.
- [51] SUN H, LESCHE R, LI D-M, LILIENTAL J, ZHANG H, GAO J, GAVRILOVA N, MUELLER B, LIU X, WU H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6199–6204.
- [52] TAMURA M, GU J, TAKINO T, YAMADA KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130<sup>Cas</sup>. *Cancer Res* 1999; **59**: 442–449.
- [53] THORSTENSEN L, LIND GE, LOVIG T, DIEP CB, MELING GI, ROGNUM TO, LOTHE RA. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 2005; **7**: 99–108.
- [54] TOLKACHEVA T, BODDAPATI M, SANFIZ A, TSUCHIDA K, KIMMELMAN AC, CHAN AM-L. Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res* 2001; **61**: 4985–4989.
- [55] TORRES J, PULIDO R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. *J Biol Chem* 2001; **276**: 993–998.
- [56] TORRES J, RODRIGUEZ J, MYERS MP, VALIENTE M, GRAVES JD, TONKS NK, PULIDO R. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem* 2003; **278**: 30652–30660.
- [57] TASHIRO H, BLAZES MS, WU R, CHO KR, BOSE S, WANG SI, LI J, PARSONS R, ELLENSON LH. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997; **57**: 3935–3940.

- [58] VASUDEVAN KM, GURUMURTHY S, RANGNEKAR VM. Suppression of PTEN expression by NF- $\kappa$ B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 1007–1021.
- [59] VAZQUEZ F, RAMASWAMY S, NAKAMURA N, SELLERS WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 5010–5018.
- [60] VIROLLE T, ADAMSON ED, BARON V, BIRLE D, MERCOLA D, MUSTELIN T, de BELLE I. The Egr-1 transcription factor directly activates *PTEN* during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 1124–1128.
- [61] VOGELMANN R, NGUYEN-TAT M-D, GIEHL K, ADLER G, WEDLICH D, MENKE A. TGF $\beta$ -induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci* 2005; **118**: 4901–4912.
- [62] WAITE KA, ENG C. BMP2 exposure results in decreased PTEN protein degradation and increased PTEN levels. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 679–684.
- [63] WAITE KA, SINDEN MR, ENG C. Phytoestrogen exposure elevates PTEN levels. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 1457–1463.
- [64] WENG L-P, BROWN JL, ENG C. PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 237–242.
- [65] WENG L-P, BROWN JL, ENG C. PTEN coordinates G<sub>1</sub> arrest by down-regulation cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 599–604.
- [66] WHANG YE, WU X, SUZUKI H, REITER RE, TRAN C, VESSELLA RL, SAID JW, ISAACS WB, SAWYERS CL. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 5246–5250.
- [67] WU RC, LI X, SCHONTHAL AH. Transcriptional activation of p21WAF1 by PTEN/MMAC1 tumor suppressor. *Mol Cell Biochem* 2000; **203**: 59–71.
- [68] WU X, HEPNER K, CASTELINO-PRABHU S, DO D, KAYE MB, YUAN X-J, WOOD J, ROSS C, SAWYERS CL, WHANG YE. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4233–4238.
- [69] YAMADA KM, ARAKI M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 2001; **114**: 2375–2382.
- [70] ZHOU X-P, GIMMO O, HAMPEL H, NIEMANN T, WALKER MJ, ENG C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without *PTEN* mutation. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1123–1128.
- [71] ZHOU X-P, MARSH DJ, HAMPEL H, MULLIKEN JB, GIMMO O, ENG C. Germline and germline mosaic *PTEN* mutations associated with a Proteus-like syndrome of hemihypertrophy, lower limb asymmetry, arteriovenous malformations and lipomatosis. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 765–768.
- [72] ZYSMAN MA, CHAPMAN WB, BAPAT B. Considerations when analyzing the methylation status of *PTEN* tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2002; **160**: 795–800.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 13.01.2006 r.*

*Przyjęto: 20.04.2006 r.*

*ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź*

*fabian@csk.umed.lodz.pl*



## STRUKTURY CYTOSZKIELETU AKTYNOWEGO FORMOWANE PRZY KRAWĘDZI WIODĄCEJ KOMÓRKI PODCZAS PIERWSZEGO ETAPU MIGRACJI

CYTOSKELETAL ACTIN STRUCTURES FORMED AT THE LEADING  
EDGE OF THE MIGRATING CELL DURING THE FIRST STEP  
OF MIGRATION

Aleksandra STĘPIEŃ, Alina GRZANKA, Adam SZPECHCIŃSKI

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

*Streszczenie:* Ekspansja krawędzi wiodącej stanowi pierwszy etap migracji komórek. Związany jest on z formowaniem zbudowanych z aktyny struktur cytoszkieletu – lamellipodiów oraz filopodiów. Ich reorganizacja, w odpowiedzi na szereg bodźców zewnątrzkomórkowych, kontrolowana jest m.in. przez białka należące do rodziny WASP (ang. *Wiskott-Aldrich syndrome protein*), będące efektorami GTPazy Rho i pośredniczące w aktywacji kompleksu Arp2/3 (ang. *actin-related protein 2-3 complex*). Najnowsze badania z zastosowaniem qFSM (ang. *quantitative fluorescent speckle microscopy*) wskazują na istnienie przy krawędzi wiodącej komórki odrębnego obszaru utworzonego z filamentów aktynowych – lamellum, odpowiedzialnego za trwałe wysunięcie krawędzi wiodącej w pierwszym etapie ruchu komórki. W pracy przedstawiono charakterystykę powyższych struktur z uwzględnieniem poznanych dotychczas mechanizmów oraz szlaków sygnałowych, prowadzących do ich formowania.

*Słowa kluczowe:* lamellipodium, filopodium, lamellum, WASP, WAVE.

*Summary:* Protrusion of the leading edge represents the first step of cell migration. This process is connected with formation of cytoskeletal actin-containing structures called lamellipodia and filopodia. Reorganization of cortical actin filaments in response to extracellular stimuli is controlled by The Wiskott-Aldrich syndrome proteins (WASP), a protein family members that are believed to be important effectors of Rho GTPases and to mediate in activating Arp2/3 (actin-related protein 2-3) complex. Recent studies using quantitative fluorescent speckle microscopy (qFSM) revealed the existence of the second region containing filamentous actin at the leading edge of migrating cells – lamellum, responsible for the persistent advancement of the cell. In this paper, characteristics of above-mentioned structures are presented and the mechanisms and signaling pathways leading to their formation, are discussed.

*Key words:* lamellipodium, filopodium, lamellum, WASP, WAVE.

*Wykaz stosowanych skrótów: ABPs (actin binding proteins) – białka wiążące aktynę; Arp 2/3 (actin-related protein 2-3 complex) – kompleks 2/3 białek spokrewnionych z aktyną; Cdc42 (cell-division cycle 42) – cykl podziału komórkowego 42; CP (capping protein) – białko czapeczkujące; Ena/VASP – enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein; EVH1 (Ena-VASP homology domain 1) – domena białek homologiczna do domeny 1 Ena-VASP; qFSM – quantitative fluorescent speckle microscopy; GBD (GTP-ase binding domain) – domena wiążąca GTP-azę; GBD/CRIB – GTPase-binding domain/Cdc42 and Rac interactive binding; PH (pleckstrin homology) – domena białek homologiczna do domeny plekstriny; Rac1 – Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; Scar/WAVE – suppressor of cyclic AMP receptor mutation/Wiskott-Aldrich verprolin homologous protein; SHD (SCAR homology domain) – domena homologiczna do domeny SCAR; WASP – Wiskott-Aldrich syndrome protein; N-WASP (neuro-nal-WASP) N-WASP – WASP w komórkach nerwowych; WH1 (WASP homology domain 1) – domena białek homologiczna do domeny 1 WASP; WHD (WAVE homology domain) – domena białek homologiczna do domeny WAVE.*

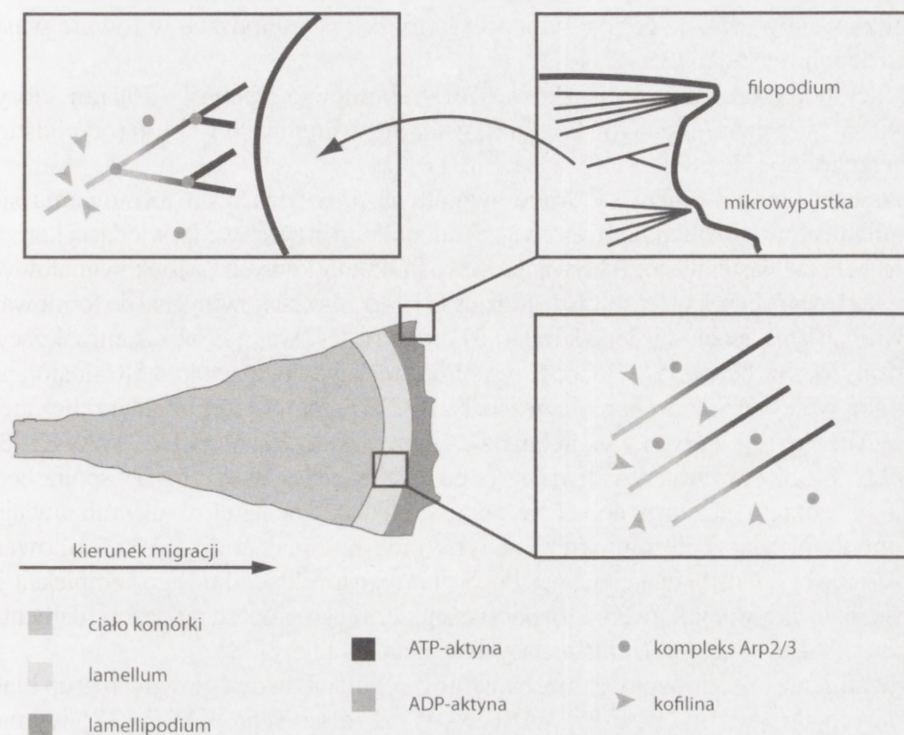
Migracja komórek umożliwia zachodzenie wielu procesów fizjologicznych, a także związana jest z szeregiem zjawisk patologicznych zachodzących w organizmie. W embriogenezie, przemieszczanie się komórek jest jednym z czynników warunkujących prawidłowy przebieg procesów morfogenezy. W organizmach dojrzałych migracja komórek zachodzi m.in. podczas gojenia się ran, odpowiedzi immunologicznej, angiogenezy oraz w jednym z etapów kancerogenezy – metastazie [17]. Ukierunkowany ruch komórek jest procesem złożonym, wymagającym integracji i precyzyjnej koordynacji szeregu zjawisk zachodzących w odrębnych obszarach komórki. Ze względu na tę czasowo-przestrzenną organizację, migracja może być rozpatrywana jako nieprzerwany cykl składający się z kilku niezależnych etapów: 1) ekspansji krawędzi wiodącej, 2) formowania miejsc przylegania powstałych wypustek do podłoża, 3) generacji naprężeń w obrębie nowo utworzonych struktur adhezyjnych, 4) deadhezji tylnej części ciała komórki i podciągnięcie jej do miejsc zakotwiczenia [1, 17, 24, 45].

Niniejsza praca przeglądowa ma na celu charakterystykę dynamicznych struktur zbudowanych z aktyny, powstających w trakcie migracji przy krawędzi wiodącej komórki oraz szlaków sygnałowych prowadzących do ich powstania.

## KRAWĘDŹ WIODĄCA KOMÓRKI

Migracja komórki w kierunku chemoatraktanta wymaga posiadania przez nią przestrzennej asymetrii, której wyrazem jest spolaryzowana morfologia, czyli wyraźne rozróżnienie pomiędzy obszarami wiodącym i tylnym [17]. Obserwacje migrujących komórek pozwoliły wyodrębnić przy ich krawędziach wiodących dwie strefy – lamellipodium i lamellum – utworzone przez częściowo pokrywające się, ale kinematycznie, kinetycznie, molekularnie oraz funkcjonalnie odrębne sieci aktynowe. Lamellipodium obejmuje obszar znajdujący się tuż pod błoną komórkową, natomiast lamellum zlokalizowane jest pomiędzy lamellipodium a ciałem komórki [22, 25, 42]. W strefie lamellipodium wyodrębnia się rozgałęzioną sieć włókien F-aktyny, natomiast lamellum zbudowane jest z długich, nierozgałęzionych filamentów aktynowych [22]. Wiele komórek eksponuje ponadto przy krawędzi wiodącej dużą liczbę rozchodzących się promieniście wypustek zbudowanych z wiązek filamentów aktynowych, mających





Rycina 1. Model migrującej komórki, uwzględniający jej kompartmentację, wyznaczoną przez rodzaj struktury cytoszkieletu aktynowego [8, 22]

średnicę 0,1–0,2  $\mu\text{m}$  i długość do kilku mikrometrów. Terminem mikrowypustki (ang. *mikrospikes*) określa się te niewykraczające poza obszar krawędzi komórki, natomiast wysunięte poza jej obręb cienkie, sztywne struktury zbudowane z wiązek filamentów nazwane zostały filopodiami. Zgodnie z powyższą nomenklaturą, mikrowypustki są częścią lamellipodium oraz potencjalnymi prekursorami filopodiów [30] (ryc. 1).

## LAMELLIPODIA

Po zastosowaniu mikroiniekcji oznakowanej fluorescencyjnie G-aktyny do fibroblastów, stwierdzono, że po kilku minutach zostaje ona włączona w sieć filamentów znajdującą się bezpośrednio pod błoną komórki, w obszar lamellipodium [24, 29, 45]. Filamenty aktynowe są supramolekularnymi strukturami spolaryzowanymi, mającymi końce (+) oraz (-). Monomery aktyny (G-aktyna) dołączane są do końca (+) filamentów w procesie polimeryzacji. Powoduje to ich wydłużanie, formowanie się wypustek w strefie wiodącej komórki, a w rezultacie jej ukierunkowany ruch [24]. Wykazano, że obszar największego natężenia polimeryzacji obejmuje pasmo o szerokości  $\sim 1 \mu\text{m}$ ,

zlokalizowane wzdłuż krawędzi wiodącej komórki, przechodzące w równie wąskie pasmo depolimeryzacji [25, 42, 44].

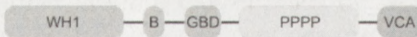
Lamellipodia są cienkimi, blaszkowatymi strukturami o grubości ~ 200 nm, których szerokość, w zależności od typu komórki, waha się w granicach 1–5  $\mu\text{m}$  (od podstawy do wierzchołka) [22, 28].

Klasyyczny model opisujący drogę sygnałową prowadzącą do formowania sieci mikrofilamentów lamellipodium oraz wiązek filopodium przy krawędzi wiodącej komórki przedstawia się następująco: Aktywacja wewnątrzkomórkowych cząstek sygnałowych: Rac1 oraz Cdc42, białek należących do rodziny GTP-az Rho, stanowi sygnał do formowania odpowiednio lamellipodiów i filopodiów [10, 37]. Rac1 i Cdc42 wiążą się z białkami należącymi do rodziny WASP [2, 19, 35, 37]. Cdc42 wspólnie z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanem ( $\text{PIP}_2$ ) aktywuje WASP oraz homologiczne: N-WASP, natomiast Rac1 białka zaliczane do Scar/WAVE, wśród których wyodrębnia się izomery WAVE1, WAVE2 i WAVE3 [37]. WASP, N-WASP oraz Scar/WAVE, należące do rodziny białek WASP, mają wspólne cechy strukturalne oraz wykazują podobieństwo pod względem biochemicznym, umożliwiające im poprzez przyłączenie monomeru aktyny oraz kompleksu Arp 2/3, formowanie trzyczęściowej jednostki funkcjonalnej. Powstanie tego trójskładnikowego kompleksu jest niezbędne do aktywacji Arp 2/3 i rozpoczęcia przez niego procesu nukleacji filamentów aktynowych jako odgałęzień już istniejących włókien F-aktyny [33].

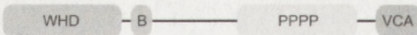
Zrozumienie tak odmiennych mechanizmów regulacji dwóch głównych grup białek należących do rodziny WASP: WASP/N-WASP oraz Scar/WAVE [37] wymaga zapoznania się z budową ich cząsteczek (ryc. 2), a co się z tym wiąże – z szeregiem homologii i rozbieżności.

Zarówno WASP/N-WASP, jak i Scar/WAVE mają na końcu karboksylowym domenę

A.



B.



RYCINA 2. Schemat budowy białek (A) WASP/N-WASP (B) Scar/WAVE [6, 33]: VCA – miejsce, do którego przyłącza się monomer aktyny oraz kompleks Arp2/3; PPPP – region bogaty w prolinę, zawiera miejsce wiązania dla profiliny oraz białek mających domeny SH3; B – odcinek zbudowany z aminokwasów konstytutywnych, pośredniczący w wiązaniu F-aktyny oraz (wyłącznie białka WASP/N-WASP)  $\text{PIP}_2$ ; GBD – miejsce wiązania Cdc42; WH1 – domena charakterystyczna dla WASP/N-WASP; WHD – domena charakterystyczna dla Scar/WAVE

katalityczną – VCA, do której przyłączają się G-aktyna oraz kompleks Arp2/3, inicjując tym samym formowanie nowych filamentów aktynowych (proces polimeryzacji). Kolejną cechą wspólną dla wszystkich białek rodziny WASP jest występowanie sąsiadującego z domeną VCA regionu bogatego w prolinę, zawierającego miejsca wiązania dla profiliny oraz mogącego wchodzić w interakcję z białkami mającymi domeny SH3. Wspólne jest ponadto występowanie fragmentu złożonego z aminokwasów konstytutywnych, który pośredniczy w wiązaniu trójskładnikowego kompleksu złożonego z cząsteczki białka rodziny WASP, G-aktyny oraz Arp2/3 do filamentu aktyny. W przypadku białek WASP/N-WASP do tego odcinka przyłączany jest także  $\text{PIP}_2$  [33].

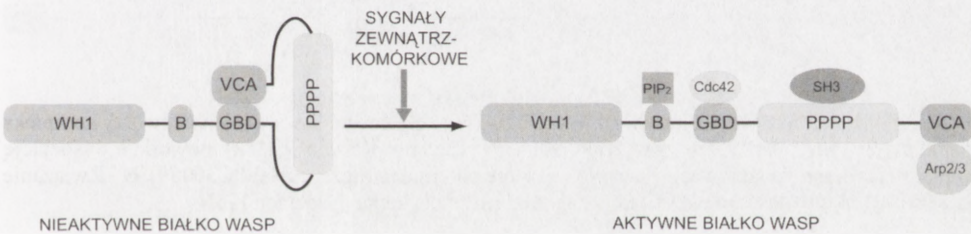


W przeciwieństwie do znaczącej homologii odcinka karboksylowego białek rodziny WASP, strukturę końca aminowego cechuje znaczne zróżnicowanie. Region N-terminalny cząsteczek WASP oraz N-WASP zawiera motyw GBD wiążący Cdc42 [39], określane również jako domena GBD/CRIB [37], oraz domenę WASP1 (WH1), nosząca także nazwy: domena Ena-VASP1 (EVH1) [6], domena plekstrynowa (PH) [35].

Białka Scar/WAVE natomiast mają na końcu aminowym odrębny, wysoce specyficzny motyw – domenę WAVE (WHD), określaną również jako SCAR (SHD). Brak domen GBD oraz WH1 w cząsteczkach Scar/WAVE [6].

### Aktywacja WASP/N-WASP

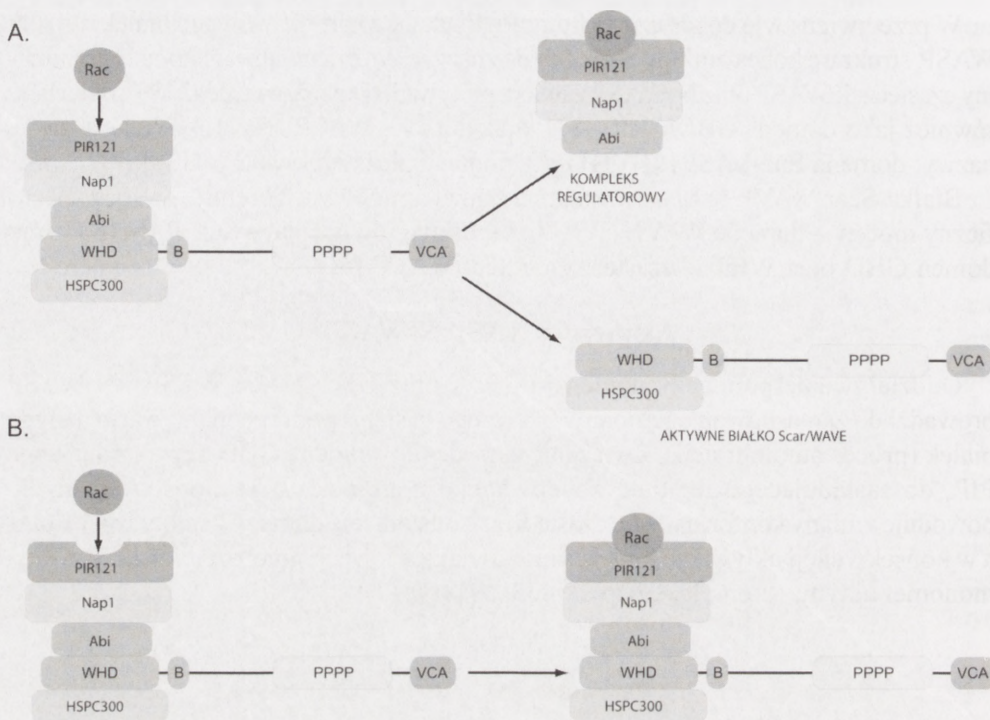
Oddziaływanie pomiędzy domenami VCA oraz GBD białek WASP i N-WASP prowadzi do zamaskowania regionu VCA, czego następstwem jest inaktywacja danych białek (proces autoinhibicji). Związanie się Cdc42 z domeną GBD oraz przyłączenie  $PIP_2$  do sąsiadującego regionu, zbudowanego z aminokwasów konstytutywnych, powoduje zmiany konformacyjne cząsteczek – odsłonięcie domeny katalitycznej VCA, a w konsekwencji aktywację białek, umożliwiającą formowanie kompleksu: WASP – monomer aktyny – kompleks Arp 2/3 [33, 37] (ryc. 3).



RYCINA 3. Model aktywacji białek WASP (N-WASP) [6]. Autoinhibicja białek zachodzi w wyniku zablokowania domeny VCA przez motyw GBD. Związanie się Cdc42 oraz  $PIP_2$  z odpowiednio: domenami GBD i B powoduje zmiany konformacyjne cząsteczek białek, prowadząc do uwolnienia końca karboksylowego i tym samym aktywacji WASP/N-WASP

### Aktywacja Scar/WAVE

Brak domeny GBD w cząsteczkach białek należących do Scar/WAVE uniemożliwia bezpośrednie przyłączenie Rac1 [9, 37, 39]. Dowiedziono, że białko WAVE1, które zlokalizowane jest bliżej jądra [34] i odpowiedzialne najprawdopodobniej za stabilizację lamellipodiów poprzez udział w formowaniu struktur adhezyjnych [46], w formie nieaktywnej, w warunkach *in vitro* tworzy kompleks z białkami: PIR 121, Nap1, Abi2 oraz HSPC300 [5, 9]. Dysocjację kompleksu inicjują białka Nck bądź Rac1, wiążące się z PIR121 i tym samym powodujące uwolnienie aktywnego WAVE1, które pozostaje związane z HSPC300 [5, 9]. Wyniki innych badań [15] wskazują, że białko WAVE2, zlokalizowane przy krawędzi wiodącej komórki [34] ulega aktywacji w wyniku przyłączenia Rac i utworzenia kompleksu WAVE2-Abi1-Nap1-PIR121. Badacze twierdzą, że powstały kompleks nie ulega dysocjacji po przyłączeniu Rac, co pozostaje w



RYCINA 4. Modele aktywacji białek Scar/WAVE: A – Nieaktywne białko Scar/WAVE tworzy kompleks z białkami PIR121, Nap1, Abi oraz HSPC300. Przyłączenie Rac do PIR121 powoduje dysocjację kompleksu i tym samym aktywację Scar/WAVE, które pozostaje związane z HSPC300 [9]. B – Związanie Rac z PIR121 aktywuje Scar/WAVE. Powstały kompleks nie ulega dysocjacji [15]

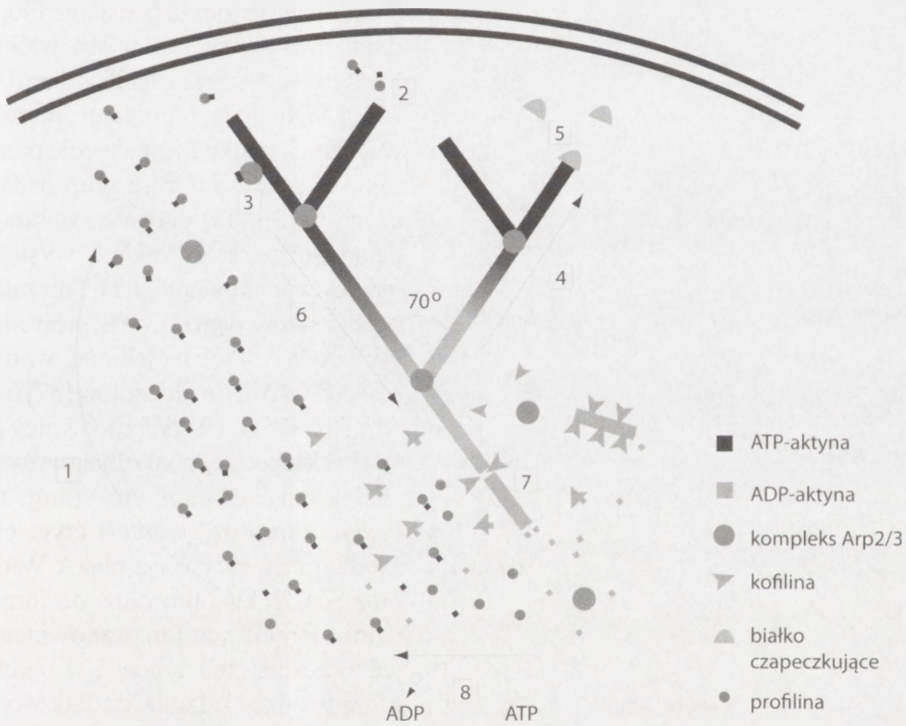
opozycji do przedstawionych powyżej wyników badań [9] (ryc. 4). Została dowiedziona także możliwość aktywacji WAVE2 przez białko Rac za pośrednictwem białka IRSp53 [20]. Wnioskuje się, że WAVE 3 tworzy tego samego rodzaju kompleksy białkowe jak izoformy WAVE1 i WAVE2, a zidentyfikowane rozbieżności mają miejsce na poziomie tkankowym i wynikają z różnic w powinowactwie do określonych i niezidentyfikowanych jeszcze białek wiążących [32].

„Dendrytyczny” model nukleacji filamentów aktynowych (ang. *the dendritic nucleation model*) opisuje proces formowania rozgałęzionej sieci filamentów lamellipodium w strefie wiodącej komórki [7, 22, 23, 24, 31, 35] następująco:

Aktywne białka WASP przyłączają monomer aktyny oraz kompleks Arp2/3, co aktywuje Arp 2/3 i stanowi warunek rozpoczęcia przez kompleks procesu nukleacji *de novo* filamentów aktynowych jako odgałęzień wcześniej istniejących filamentów. W konsekwencji, powstają rozwidlenia (ang. *Y-junctions*) pod charakterystycznym dla opisywanych struktur kątem  $\sim 70^\circ$ . Do końców (+) powstałej w ten sposób, rozgałęzionej sieci mikrofilamentów są dodawane następnie monomery aktyny związane z ATP (w większości transportowane w kompleksie z profiliną). Proces elongacji włókien F-aktyny kontrolowany jest jednocześnie przez białka „czapeczkujące” (CP), które wiążąc końce (+) filamentów hamują dalsze ich wydłużanie. Podczas polimeryzacji lub w krótkim czasie



po jej zejściu, nukleotyd ulega hydrolizie do ADP i Pi. Odłączenie fosforanu zmniejsza powinowactwo kompleksu Arp2/3 do F-aktyny ~ 20-krotnie, powodując dysocjację i rozpad filamentów aktynowych. Proces ten wzmacniany jest przez niektóre białka, m.in. kofilinę, która przyłączając się do ADP-aktyny powoduje cięcie i depolimeryzację jej końca (-). Monomery aktyny związane z kofiliną, uwolnione w wyniku dysocjacji łączą się następnie z profiliną, rywalizującą z kofiliną o możliwość związania z G-aktyną. Profilina intensyfikuje ponadto wymianę ADP związanego z aktyną na obecny w cytoplazmie ATP. Powstała w ten sposób pula monomerów aktyny związanych z profiliną może być wykorzystana do elongacji rosnącego końca (+) (ryc. 5).



RYCINA 5. „Dendrytyczny” model nukleacji filamentów aktynowych [23, 24]: 1 – monomery ATP-aktyny transportowane w kompleksie z profiliną, 2 – przyłączenie cząstek G-aktyny do rosnącego końca (+) filamentu w procesie polimeryzacji, 3 – aktywny kompleks Arp2/3 formujący odgańlenia filamentów aktynowych, 4 – wydłużanie włókien F-aktyny, 5 – przyłączenie się białek CP do końców (+) filamentów – zablokowanie polimeryzacji, 6 – hydroliza związanego z monomerem aktyny ATP do ADP i Pi, 7 – przyłączenie kofiliny do ADP-aktyny, cięcie i depolimeryzacja końca (-) filamentu, 8 – kataliza wymiany ADP na ATP zachodząca przy udziale profiliny

## FILOPODIA

Filopodia obecne są przy krawędzi wiodącej pewnych typów komórek. Stożki wzrostu komórek nerwowych oraz większość fibroblastów wykształca te struktury, natomiast nie stwierdzono ich występowania w keratynocytach ryb i neutrofilach ssaków [22].

Filopodia, w przeciwieństwie do rozgałęzionej sieci filamentów aktynowych lamellipodium, zbudowane są z długich, dorastających w pewnych typach komórek do 50  $\mu\text{m}$  [12] wiązek F-aktyny [7, 17, 35, 36]. Liczba filamentów aktynowych budujących filopodium oraz towarzyszących im białek sieciujących (ang. *cross linking proteins*)

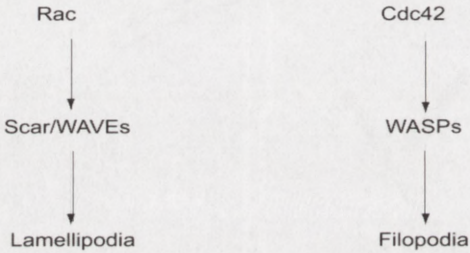
determinuje elastyczność wypustki [41]. Twierdzi się, że podstawa filopodium, zakotwiczona jest w sieci włókien F-aktyny w obszarze lamellipodium [36, 40].

Mechanizm regulujący powstawanie tych struktur jest obecnie przedmiotem dyskusji. Część grup badawczych [4, 36, 43] podważa słuszność paradygmatu, który zakłada występowanie dwóch równoległych i niezależnych szlaków sygnałowych, prowadzących od WASP do lamellipodiów oraz od Scar/WAVE do filopodiów [37] (ryc. 6a).

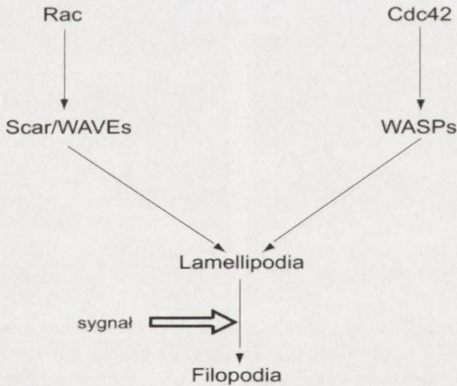
Biyasheva i współpracownicy [4] wysunęli hipotezę, która została nazwana „szlakiem kaskadowym” (ang. *the cascade pathway model*) (ryc. 6b). Według niej, aktywacja białek WASP oraz Scar/WAVE prowadzi do formowania lamellipodium stanowiącego jednocześnie „fundament”, w obrębie którego, przy udziale dodatkowych sygnałów, zachodzi reorganizacja cytoszkieletu i formowanie filopodiów.

Równolegle, ta sama grupa badawcza zaproponowała będący dopełnieniem poprzedniego model, określane jako „konwergentne wydłużanie się” (ang. *convergent elongation*) [36, 43]. Zakłada on mianowicie, że białka kompleksu Arp2/3 biorą udział w powstawaniu rozgałęzionej sieci filamentów aktynowych, która poprzez formowanie struktur pośrednich, podlega następnie reor-

A.



B.



RYCINA 6. Modele regulacji powstawania lamellipodiów i filopodiów. A – Niezależne szlaki sygnałowe: aktywacja białek Scar/WAVEs poprzez przyłączenie Rac prowadzi do formowania lamellipodiów; związanie Cdc42 z białkami WASPs inicjuje tworzenie filopodiów [10, 37]. B – Szlak kaskadowy: aktywacja białek Scar/WAVEs oraz WASPs przez odpowiednio: Rac i Cdc42, prowadzi do formowania lamellipodiów, które po zadziałaniu dodatkowych sygnałów są transformowane w filopodia [4]



ganizacji w równoległe wiązki F-aktyny. Wyniki wcześniej przeprowadzonych badań [3] dowodzą, że białka Ena/VASP oraz białka „czapeczkujące” rywalizują o wiązanie z końcem (+) nowo powstałych, przy udziale Arp 2/3, filamentów aktynowych, a funkcją Ena/VASP jest podtrzymanie dalszego ich wydłużania. Autorzy omawianego modelu twierdzą, że dzięki niewyjaśnionemu do tej pory mechanizmowi, prekursorzy filopodiów związane w regionie rosnącym (+) filamentu z grupą białek, najprawdopodobniej z Ena/VASP, tracą zdolność tworzenia rozgałęzień i formują równoległe wiązki, stabilizowane przez białko sieciujące – fascynę. Badacze sugerują, że rekrutacja i/lub aktywacja fascyny w części szczytowej prekursorów powoduje sieciowanie zlokalizowanych tam filamentów i tym samym formowanie ułożonych równoległe wiązek F-aktyny. Przeprowadzenie kolejnych doświadczeń, umożliwiło dalszą analizę opisywanego procesu oraz udoskonalenie wcześniejszych założeń. Stwierdzono [18], że „decyzja” o formowaniu wiązek filamentów filopodiów bądź kontynuowaniu tworzenia rozgałęzionej sieci F-aktyny lamellipodium zależna jest od aktywności białek „czapeczkujących” (CP). Autorzy sugerują, że CP funkcjonuje w cytoszkielecie jako negatywny regulator filopodiów oraz pozytywny lamellipodiów. Mechanizm regulacji CP nie został do końca wyjaśniony. Zidentyfikowano dotychczas dwa białka oddziałujące z CP: V-1, formujący stabilny kompleks z CP i tym samym hamujący jego wiązanie z F-aktyną [38] oraz CARMIL, wyizolowany z *Dictyostelium* i *Acanthamoeba* [16, 27], którego wpływ na CP pozostaje przedmiotem badań. W procesie regulacji wydłużania końców (+) filamentów podkreśla się także udział białek działających antagonistycznie w stosunku do CP, którymi są wspomniane wcześniej Ena/VASP [3] oraz zidentyfikowane niedawno forminy. W warunkach *in vitro*, forminy wiążą się z końcem (+) filamentów aktynowych [11, 26] zabezpieczając je przed „czapeczkowaniem” przez CP i tym samym umożliwiając dalszą elongację polimerów aktyny [11, 14, 21, 26, 47].

## LAMELLA

Badania przeprowadzone z zastosowaniem qFSM dowiodły, że większość (80–95%) filamentów aktynowych, powstałych w procesie polimeryzacji w obszarze lamellipodium, ulega depolimeryzacji w odległości 1–3  $\mu\text{m}$  od krawędzi komórki, w strefie przejściowej pomiędzy lamellipodium a lamellum [25, 42, 44]. Lamellum zbudowane jest z długich i nierozgałęzionych włókien F-aktyny, obejmujących obszar mieszczący się w granicach 3–15  $\mu\text{m}$  (licząc od krawędzi komórki) [25], przestrzeń pomiędzy lamellipodium a ciałem komórki [22]. Przypuszcza się, że filamenty aktynowe lamellum nie są formowane poprzez reorganizację sieci filamentów lamellipodium, ale powstają w wyniku niezależnej asocjacji [25, 42]. Charakterystyczne dla rozgałęzionej sieci filamentów lamellipodium białka kompleksu Arp2/3 oraz ADF/kofilina [23] nie są aktywne w obszarze lamellum. Zidentyfikowano tam natomiast miozynę II oraz tropomiozynę [8, 24]. Opisywane struktury różni ponadto natężenie procesów polimeryzacji i depolimeryzacji filamentów aktynowych, które w obszarze lamellipodium jest wyższe ~ 10-krotnie w stosunku do lamellum [25, 42], a cykl zachodzi w sposób ciągły [25, 44].

Lamellum cechuje wolniejsze tempo reorganizacji cytoszkieletu, a procesy polimeryzacji i depolimeryzacji występują punktowo [25, 42]. Połączenia pomiędzy filamentami lamellum i lamellipodium cechuje występowanie struktur adhezyjnych, utworzonych przez transmembranowe kompleksy integryn oraz białek wiążących aktynę (ABPs), odpowiadających za przełożenie aktomiozynowego skurczu powstałego w lamellum na siłę ciągnącą komórkę po powierzchni macierzy pozakomórkowej (zewnątrzkomórkowego matriks) [25]. Wyniki najnowszych badań [13, 25] wskazują, że między innymi lamella, a nie lamellipodia powodujące bezładne wypychanie i cofanie krawędzi wiodącej komórki [25], odpowiadają za jej efektywne i trwałe wysunięcie. Sugeruje się [13], że funkcją lamellipodium jest analiza środowiska oraz zapewnienie natychmiastowej odpowiedzi na różnorodne bodźce kierunkowe, natomiast lamellum odpowiedzialne jest za efektywny ruch komórki w pierwszym etapie migracji.

## PODSUMOWANIE

Pierwszy etap migracji komórki polega na wysunięciu jej krawędzi wiodącej. Proces ten związany jest z dynamiczną reorganizacją cytoszkieletu aktynowego i formowaniem takich struktur cytoszkieletu, jak: lamellipodia, filopodia czy zidentyfikowane niedawno lamella. Drogi sygnałowe, prowadzące do powstania powyższych struktur są wciąż przedmiotem dyskusji. Część grup badawczych odrzuca założenie mówiące o występowaniu niezależnych szlaków sygnałowych, prowadzących od N-WASP do lamellipodiów oraz od Scar/WAVE do filopodiów. Sugeruje się natomiast formowanie filopodiów poprzez reorganizację sieci filamentów lamellipodium, w której decydującą rolę pełnią białka CP oraz Ena/VASP. Interesujących wyników dostarczyły badania prowadzone przez Ponti [25] i Vallotton [42] wskazujące na fakt występowania przy krawędzi wiodącej komórek długich, nierozgałęzionych włókien F-aktyny, różniących się istotnie od rozgałęzionej sieci filamentów lamellipodium. Wyniki ostatnich eksperymentów [13], w których zahamowano tworzenie się lamellipodiów, pozwalają przypuszczać, że są one zbędne w procesie generacji ruchu komórki. Sugeruje się, że za trwałe wysunięcie krawędzi wiodącej komórki w pierwszym etapie jej ruchu odpowiedzialne jest lamellum. Uzyskane w wyniku powyższych doświadczeń informacje nasuwają wiele pytań. Czy filopodia powstają w wyniku reorganizacji filamentów lamellipodium czy lamellum? Jaki jest mechanizm powstawania filamentów lamellum? Co determinuje szerokość lamellipodium? Odpowiedź na te i wiele innych pytań dostarczą kolejne badania w tym zakresie.

## LITERATURA

- [1] BAILLY M, CONDEELIS J. Cell motility: insights from the backstage. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: E292–294.
- [2] BEAR JE, KRAUSE M, GERTLER FB. Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 158–166.
- [3] BEAR JE, SVITKINA TM, KRAUSE M, SCHAFFER DA, LOUREIRO JJ, STRASSER GA, MALY IV, CHAGA OY, COOPER JA, BORISY GG, GERTLER FB. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 2002; **109**: 509–521.



- [4] BIYASHEVA A, SVITKINA T, KUNDA P, BAUM B, BORISY G. Cascade pathway of filopodia formation downstream of SCAR. *J Cell Sci* 2004; **117**: 837–848.
- [5] BLAGG SL, INSALL RH. Solving the WAVE function. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 279–281.
- [6] BOMPARD G, CARON E. Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol* 2004; **166**: 957–962.
- [7] BORISY GG, SVITKINA TM. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 104–112.
- [8] DesMARAIS V, ICHETOVKIN I, CONDEELIS J, HITCHCOCK-DeGREGORI SE. Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J Cell Sci* 2002; **115**: 4649–4660.
- [9] EDEN S, ROHATGI R, PODTELEJNIKOV AV, MANN M, KIRSCHNER MW. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 2002; **418**: 790–793.
- [10] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; **420**: 629–635.
- [11] EVANGELISTA M, ZIGMOND S, BOONE C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2603–2611.
- [12] FRIEDL P, WOLF K. Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Rev Cancer* 2003; **3**: 362–374.
- [13] GUPTON SL, ANDERSON KL, KOLE TP, FISCHER RS, PONTI A, HITCHCOCK-DeGREGORI SE, DANUSER G, FOWLER VM, WIRTZ D, HANEIN D, WATERMAN-STORER CM. Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J Cell Biol* 2005; **168**: 619–631.
- [14] HARRIS ES, LI F, HIGGS HN. The mouse forming, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem* 2004; **279**: 20076–20087.
- [15] INNOCENTI M, ZUCCONI A, DISANZA A, FRITTOLE E, ARECES LB, STEFFEN A, STRADAL TE, DI FIORE PP, CARLIER MF, SCITA G. Abi1 is essential for the formation and activation of WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 319–327.
- [16] JUNG G, REMMERT K, WU X, VOLOSKY JM, HAMMER JA. 3RD The Dictyostelium CARMIL protein links capping proteins and Arp 2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1479–1497.
- [17] LAUFFENBURGER DA, HORWITZ AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; **84**: 359–369.
- [18] MEJILLANO MR, KOJIMA S, APPLEWHITE DA, GERTLER FB, SVITKINA TM, BORISY GG. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 2004; **118**: 363–373.
- [19] MIKI H, TAKENAWA T. Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem* 2003; **134**: 309–313.
- [20] MIKI H, YAMAGUCHI H, SUETSUGU S, TAKENAWA T. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 2000; **408**: 732–735.
- [21] MOSELEY JB, SAGOT I, MANNING AL, XU Y, ECK MJ, PELLMAN D, GOODE BL. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 896–907.
- [22] NICHOLSON-DYKSTRA S, HIGGS HN, HARRIS ES. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr Biol* 2005; **15**: R346–R357.
- [23] POLLARD TD, BLANCHOIN L, MULLINS RD. Actin dynamics. *J Cell Sci* 2001; **114**: 3–4.
- [24] POLLARD TD, BORISY GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; **112**: 453–465.
- [25] PONTI A, MACHACEK M, GUPTON SL, WATERMAN-STORER CM, DANUSER G. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 2004; **305**: 1782–1786.
- [26] PRUYNE D, EVANGELISTA M, CHANGSONG Y, BIE, ZIGMOND S, BRETSCHER A, BOONE C. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 2002; **297**: 612–615.
- [27] REMMERT K, OLSZEWSKI TE, BOWERS MB, DIMITROVA M, GINSBURG A, HAMMER JA. 3RD CARMIL is a bona fide capping protein interactant. *J Biol Chem* 2004; **279**: 3068–3077.
- [28] SMALL JV, RESCH GP. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 517–523.
- [29] SMALL JV, ROTTNER K, KAVERINA I, ANDERSON KI. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 271–281.

- [30] SMALL JV, STRADAL T, VIGNAL E, ROTTNER K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 112–120.
- [31] STĘPIEŃ A, GRZANKA A, OSTROWSKI M. Białka kompleksu ADF/kofilina: regulacja dynamiki filamentów aktynowych. *Kosmos* 2005; **54**: 381–389.
- [32] STOVOLD CF, MILLARD TH, MACHESKY LM. Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BCM. Cell Biol* 2005; **6**: 11.
- [33] STRADAL TE, ROTTNER K, DISANZA A, CONFALONIERI S, INNOCENTI M, SCITA G. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 2004; **14**: 303–311.
- [34] SUETSUGU S, YAMAZAKI D, KURISU S, TAKENAWA T. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell* 2003; **5**: 595–609.
- [35] SVITKINA TM, BORISY GG. Progress in protrusion: the tell-tale scar. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 432–436.
- [36] SVITKINA TM, BULANOVA EA, CHAGA OY, VIGNJEVIC DM, KOJIMA S, VASILIEV JM, BORISY GG. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 2003; **160**: 409–421.
- [37] TAKENAWA T, MIKI H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 2001; **114**: 1801–1809.
- [38] TAOKA M, ICHIMURA T, WAKAMIYA-TSURUTA A, KUBOTA Y, ARAKI T, OBINATA T, ISOBE T. V-1, a protein expressed transiently during murine cerebellar development, regulates actin polymerization via interaction with capping protein. *J Biol Chem* 2003; **278**: 5864–5870.
- [39] THRASHER AJ. WASP in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 635–646.
- [40] TSENG Y, AN KM, ESUE O, WIRTZ D. The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1819–1826.
- [41] TSENG Y, FEDOROV E, McCAFFERY JM, ALMO SC, WIRTZ D. Micromechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin: a comparison with  $\alpha$ -actinin. *J Mol Biol* 2001; **310**: 351–366.
- [42] VALLOTTON P, GUPTON SL, WATERMAN-STORER CM, DANUSER G. Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9660–9665.
- [43] VIGNJEVIC D, YARAR D, WELCH MD, PELOQUIN J, SVITKINA T, BORISY GG. Formation of filopodia-like bundles *in vitro* from a dendritic network. *J Cell Biol* 2003; **160**: 951–962.
- [44] WATANABE N, MITCHISON TJ. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 2002; **295**: 1083–1086.
- [45] WEBB DJ, PARSONS JT, HORWITZ AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: E97–100.
- [46] YAMAZAKI D, FUJIWARA T, SUETSUGU S, TAKENAWA T. A novel function of WAVE in lamellipodia: WAVE1 is required for stabilization of lamellipodial protrusions during cell spreading. *Genes Cells* 2005; **10**: 381–392.
- [47] ZIGMOND SH, EVANGELISTA M, BOONE C, YANG C, DAR AC, SICHERI F, FORKEY J, PRING M. Formin leaky cap allowing elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol* 2003; **13**: 1820–1823.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 04.02. 2006 r.

Przyjęto: 28.04. 2006 r.

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

e-mail: a\_stepien@cm.umk.pl



## MOLEKULARNY ZEGAR I GRADIENT MORFOGENÓW REGULUJĄ SOMITOGENEZĘ U KRĘGOWCÓW

MOLECULAR OSCILLATORY CLOCK AND MORPHOGEN GRADIENT  
REGULATE THE SOMITOGENESIS IN VERTEBRATES

Zofia BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

*Streszczenie:* Somitogeneza, w czasie której z przyosiowej mezodermy tworzą się somity, jest podstawą segmentacji ciała u kręgowców. Somity są strukturami przejściowymi dającymi początek kręgom, mięśniom szkieletowym i skórze właściwej. U kręgowców wszystkie komórki przyosiowej mezodermy przechodzą przez trzy fazy różnicowania i dojrzewania, które są ściśle regulowane na poziomie przestrzennym i czasowym. W pierwszej fazie komórki macierzyste, zlokalizowane w smudze pierwotnej, a następnie w pączku ogonowym, przekształcają się w komórki progenitorowe, które tworzą mezodermę przedsomitową w formie dwóch pasm komórek mezenchymatycznych biegnących po obu stronach cewy nerwowej i struny grzbietowej. Faza przygotowania do segmentacji zachodzi w przedsomitowej mezodermie na poziomie molekularnym. W fazie segmentacji tworzą się granice somitu i zachodzi epitelizacja komórek mezenchymatycznych. Dane z ostatnich kilku lat wskazują, że somitogeneza jest kontrolowana przez molekularny zegar oscylacyjny oraz przez gradienty morfogenu. Podstawą zegara oscylacyjnego jest periodyczna ekspresja pewnych genów, z których większość jest związana z sygnalizacją Notch. Z zegarem oscylacyjnym powiązany jest dynamiczny gradient morfogenu FGF, Wnt3a oraz kwasu retinowego. W artykule omówiono mechanizm działania molekularnego oscylacyjnego zegara u zarodków dania, kury i myszy.

*Słowa kluczowe:* somitogeneza, zegar molekularny, zarodek kręgowców.

*Summary:* The segmentation of the vertebrate body is established by somitogenesis, during which somite form sequentially in a rhythmic fashion from the paraxial presomitic mesoderm. The somites are transient embryonic segments giving rise to the vertebrae, the skeletal muscles and dorsal epidermis. In vertebrates, all cells of the paraxial mesoderm go successively through the three phases of differentiation and maturation, which are tightly regulated at the spatio-temporal level. A growth phase during which progenitor cells are produced from mesodermal stem cells, which are localised in the primitive streak and latter in the tail bud, and become organised as two streaks of the mesenchymal cells bilaterally to the neural tube and notochord forming the presomitic mesoderm. A patterning phase occurring in the presomitic mesoderm

during which the segmental pattern is established on the molecular level. A segmentation phase in which the somite boundaries are formed and epithelization of mesenchymal cells occurs. Recent data suggest that the molecular oscillatory [segmentation] clock and gradients of signalling molecules control the somitogenesis. The periodic expression of several genes, most of which are related to the Notch signalling pathway, is the base of the oscillatory clock. Dynamic gradient of retinoic acid and morphogens FGF6 and Wnt3a are coupled with molecular oscillatory clock. In this review the mechanism of oscillatory clock in zebrafish, chick and mouse embryos is described.

*Key words:* somitogenesis, molecular clock, vertebrate embryo.

## WSTĘP

Jednym z podstawowych procesów w rozwoju zarodków kręgowców jest somitogeneza, w wyniku której powstają somity, odrębne segmenty ułożone parami wzdłuż struny grzbietowej i cewy nerwowej. Somity tworzą się kolejno od przodu ku tyłowi, pierwsza para widoczna jest na poziomie pęcherzyka ocznego zarodka. Liczba somitów jest stała dla danego gatunku, np. u kury wynosi 52, u myszy 65 [37]. Z somitów tworzą się kręgi, mięśnie szkieletowe i skóra właściwa. Różnicowanie się somitów w te struktury jest dobrze poznane i opisane w podręcznikach [8,39]. W ostatnich kilku latach zainteresowano się specjalnie początkowymi etapami somitogenezy, ponieważ, jak się okazało, w tym okresie zachodzi w mezodermie przedsomitowej naprzemienne regularne aktywowanie i hamowanie ekspresji niektórych genów, co w zasadniczy sposób wpływa na wyodrębnianie i różnicowanie się somitów.

Badania nad somitogenezą są prowadzone głównie na zarodkach 3 gatunków kręgowców: ryby danio pręgowany (*Danio regio*), kury i myszy. Zarodki danio są dostępne w dużej liczbie, przechodzą szybki rozwój, somitogeneza trwa u nich około 14 godzin, można również łatwo uzyskać u tych ryb ukierunkowane mutacje genetyczne. Podobnie ze względu na dostępność do manipulacji eksperymentalnej badana jest somitogeneza u zarodków kur. Z kolei analiza rozwoju licznych mutacji genetycznych spontanicznych i ukierunkowanych wywoływanych u myszy dostarcza wielu cennych informacji o zaburzeniach w prawidłowej somitogenezie.

## POWSTAWANIE I RÓŻNICOWANIE MORFOLOGICZNE PRZYOSIOWEJ MEZODERMY SOMITOWEJ

Na wstępie należy przypomnieć, że u owodniowców (ptaki i ssaki) gastrulacja rozpoczyna się w obrębie tarczki zarodkowej, złożonej z dwóch warstw komórek epiblastu i hypoblastu. Komórki epiblastu tworzą następnie właściwy zarodek. Tarczka zarodkowa jest spolaryzowana i można w niej wyróżnić część przednią (A – anterior) poprawnie nazywaną rostralną, z której rozwijają się głównie przednie części zarodka oraz część tylną (P – posterior) nazywaną kaudalną. Część komórek epiblastu

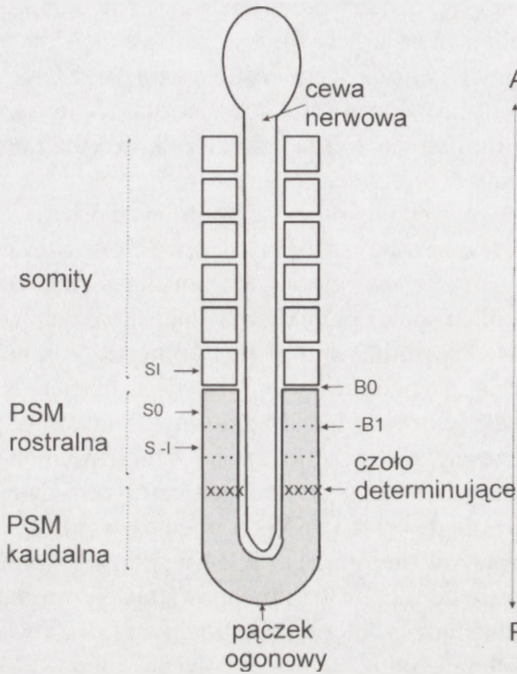


przemieszcza się przez smugę pierwotną i węzeł pierwotny (Henzena) pod epiblast i tworzy mezoderbę. Na skutek tej migracji smuga pierwotna stopniowo się skraca i zanika. Zależnie od położenia, czasu migracji i późniejszego różnicowania oraz funkcji wyróżnia się mezoderbę głowową, osiową, przyosiową, pośrednią i boczną. W pierwszej kolejności z epiblastu wysuwają się w linii środkowej tarczki zarodkowej komórki mezodermy głowowej i osiowej, tj. struny grzbietowej i razem z formującą się cewą nerwową przemieszczają się rostralnie. W następnej kolejności migrują po obydwóch stronach struny grzbietowej komórki przeznaczone na somity tworzące przyosiową, przedsomitową mezoderbę – **PSM** (*presomatic mesoderm*). Komórki przeznaczone na PSM zatrzymują się na rostralnym końcu smugi pierwotnej i stają się rezydującą pulą komórek macierzystych dla PSM. Po zaniku smugi pierwotnej te komórki macierzyste lokują się w przedniej części pączka ogonowego. [7]. Komórki macierzyste dostarczają puli komórek prekursorowych tworzących PSM i somity. Pula komórek prekursorowych rozdziela się na dwie części, które przesuwały się wzdłuż pomiędzy ektoderma powierzchniową a endoderma jelitową po obu bokach cewy nerwowej i struny grzbietowej. Tworzą się dwa równoległe pasma PSM, których rozwój i dalsze różnicowanie są ściśle ze sobą zsynchronizowane (ryc. 1). PSM wydłuża się przez apozycję, tj. odkładanie, gdy przyłącza się do niej grupa nowopowstałych komórek prekursorowych. Wydłużanie się PSM zachodzi w kierunku kaudalnym (ku tyłowi), podczas gdy rostralnie (na przodzie) następuje oddzielenie się nowego somitu. PSM ma więc dwa etapy rozwoju: pierwszy z komórek macierzystych, które migrują przez smugę pierwotną i węzeł pierwotny, oraz drugi, kiedy PSM tworzy się z komórek macierzystych rezydujących w pączku ogonowym. Z PSM powstałej w pierwszym etapie tworzą się somity szyjne, położone najbardziej rostralnie, pozostałe somity tworzą się z komórek macierzystych rezydujących w pączku ogonowym. Na przykład u zarodka kury migracja komórek z epiblastu i regresja smugi pierwotnej kończy się po wytworzeniu około 16 somitów szyjnych, a komórki uczestniczące w tworzeniu somitów lędźwiowych, krzyżowych i ogonowych pochodzą z pączka ogonowego [18].

Liczba komórek macierzystych dla PSM rezydujących w smudze pierwotnej jest niewielka. U zarodka myszy w 7,5 dpc<sup>1</sup> jest ich 100 do 150 [54]. Ulegają one niesymetrycznym podziałom mitotycznym, przez co dostarczają nowej puli komórek prekursorowych dla PSM, a jednocześnie część ich pozostaje nadal rezydującymi, samoodnawiającymi się komórkami macierzystymi [36, 57]. Nie wiadomo, jak regulowane są te podziały.

Samoodnawiające się komórki macierzyste mają charakter komórek mezenchymatycznych, stanowią zwartą (koherentną) grupę. Uważa się, że pochodzące z nich komórki prekursorowe PSM zachowują również zwartość dzięki podziałom klonalnym. Ruchy komórek w obrębie grupy komórek prekursorowych, a następnie w PSM są bardzo ograniczone. Komórki zachowują ułożenie klonami, a wbrew dawnym poglądom [74] w PSM nie zachodzi mieszanie się komórek wzdłuż osi A/P. Co więcej wykazano, że już w tarczce zarodkowej odmiennie są zlokalizowane komórki przeznaczone na przyśrodkowe i boczne części PSM, a następnie także na przyśrodkowe i boczne części

<sup>1</sup>Dpc – dzień po zapłodnieniu – *day post coitum*



RYCINA.1. Schemat rozmieszczenia pęczka ogonowego, mezodermi przedsomitowej – PSM i somitów u zarodków kręgowców: SI – ostatnio wytworzony somit, S0 – szczytowa część PSM, z której zostanie wytworzony następny somit; S-1 – materiał na presumptywny kolejny somit; B0 – szpara pomiędzy S0 a SI; B-1 – presumptywna szpara pomiędzy somitami. Oznaczenia według nomenklatury proponowanej przez Pourquie i Tam [60]

somitów. Presumptywne komórki przyśrodkowe są ulokowane bardziej z przodu tarczki niż presumptywne komórki boczne. Wykazano również, że tylko komórki przyśrodkowe PSM mają informacje dla rozwoju w somity, gdyż po rozdzieleniu podłużnie PSM kury tylko jej część przyśrodkowa rozwija się w somity *in vitro* [24].

Koherentne ułożenie komórek prekursorowych prowadzi do tworzenia statycznej struktury z nielicznymi podziałami komórkowymi i niewielkimi ruchami komórek, zwanej kohortą komórek stanowiącej w istocie zawiązek pojedynczego somitu [20]. Komórki kohorty pozostają w jednym miejscu na określonym poziomie osi A/P zarodka i w tym jednym miejscu realizują one cały program rozwoju somitu. Podlegają więc stale takim samym wpływom sąsiednich narządów pierwotnych, tj. cewy nerwowej, struny grzbietowej, mezodermi bocznej i ektodermi powierzchniowej. PSM jest więc zespołem liniowo ułożonych kohort komórek o różnym stopniu zaawansowania somitogenezy (ryc. 1 i 2). Stąd oglądana w całości odbija wszyst-

kie kolejne etapy somitogenezy zachodzące w pojedynczej kohorcie. Cała PSM, począwszy od pęczka ogonowego do pierwszego somitu szyjnego, może być traktowana jak taśma filmowa złożona z kolejnych klatek, z których każda odpowiada kolejnemu stadium rozwojowemu w innym czasie. Większość autorów opisujących somitogenezę traktuje PSM jako dynamiczną całość i wyróżnia w niej dwa obszary: rostralny (przedni) i kaudalny (tylny). W obszarze rostralnym znajdują się kohorty komórek o zaawansowanej somitogenezie, w kaudalnym w początkowych jej etapach. Kaudalny obszar jest dynamiczny, bowiem tu w określonych odstępach czasu dołączane są nowe kohorty komórek prekursorowych i dzięki temu obszar ten przesuwa się ku tyłowi zarodka. Tworzą go stosunkowo luźno ułożone komórki mezenchymatyczne. Obszar kaudalny u zarodka kury obejmuje 2/3 PSM [18]. Obszar rostralny jest stabilny, nie obserwuje się w nim ruchów komórek ani mitoz. Od rostralnej części oddzielają się kolejno somity jako odrębne struktury. Oddzielanie się nowego somitu od PSM na ogół nazywane jest segmentacją. Jest ona związana z epitelizacją komórek (tj. przekształcaniem się komórek mezenchymatycznych w nabłonkowe) oraz z wytworzeniem granic somitu i jego polaryzacją.



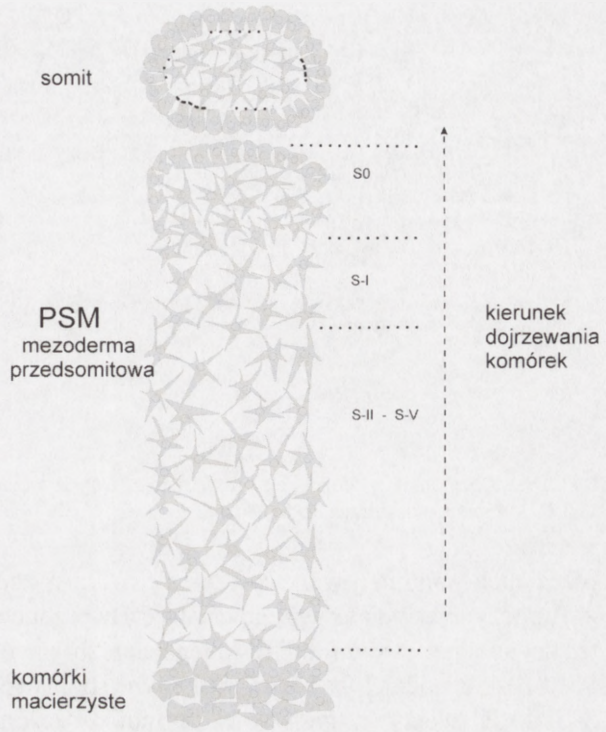
Nowopowstały somit jest wyraźnie spolaryzowany wzdłuż osi A/P oraz grzbietowo-brzusznie, można w nim wyróżnić część rostralną i kaudalną oraz grzbietową i brzuszną, o odmiennym charakterze morfologicznym komórek. Części te różnicują się następnie w odmiennie tkanki. Część grzbietowa daje początek dermatomiotomowi, część brzuszna sklerotomowi.

Przemiany morfologiczne komórek w kohorcie, prowadzące do wytworzenia somitu, polegają na zagęszczeniu komórek przez zmniejszenie przestrzeni międzykomórkowej, a następnie ich epitelizacji, czyli zmianie ich kształtu z typu mezenchymatycznego na nabłonkowy. Z kolei pomiędzy nowopowstałym somitem a rostralną częścią PSM tworzy się wyraźna szpara. Zmiany te zachodzą u wszystkich kręgowców, mimo różnic w ich

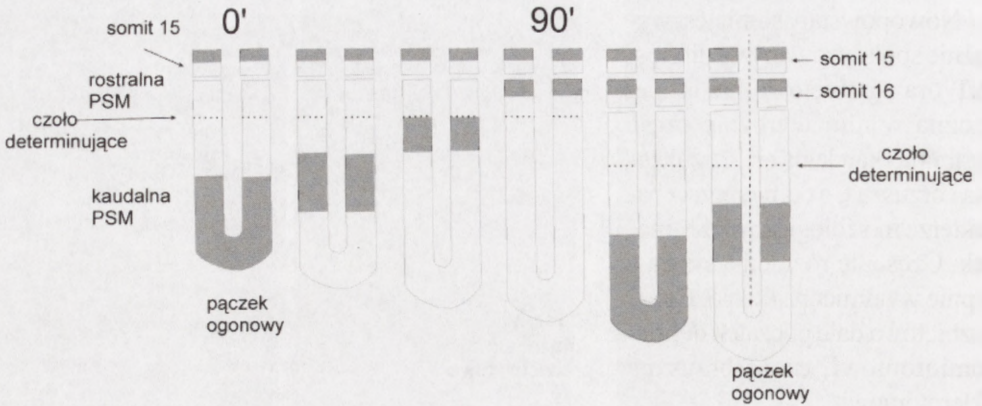
przebiegu w poszczególnych gromadach. U owodniowców wyodrębnia się najpierw, na skutek kompaktacji, grupa komórek zwana somitomerem, który przekształca się w somit. U kury i przepiórki nowopowstały somit ma charakter kuli wypełnionej w środku komórkami mezenchymatycznymi, otoczonej zewnętrzną warstwą nabłonkową komórek. Somit kury na poziomie skrzydła ma około 2500 komórek [11]. U myszy epitelizacji podlega tylko część grzbietowa i boczna powstającego somitu, podczas gdy część przyśrodkowa zachowuje charakter mezenchymatyczny. Somit żaby szponiastej *Xenopus* składa się z równolegle ułożonych, wydłużonych środkowo-bocznie komórek i w czasie tworzenia ulega rotacji. Somit ryby danio, podobnie jak u owodniowców, jest kulisty.

Podkreślić trzeba, że komórki w obrębie PSM komunikują się ze sobą przez połączenia szczelinowe (*nexus*). Dowodzi tego obserwacja, że wprowadzony do kaudalnej części PSM barwnik rodamina pojawia się kolejno w komórkach przesuając ku przodowi i zatrzymuje dopiero w komórkach położonych na samym brzegu rostralnym PSM [76].

Dla ujednoczenia opisów eksperymentów prowadzonych przez różnych badaczy oraz dla łatwiejszego porozumienia, Pourquie i Tam [61] zaproponowali nomenklaturę dla mezodermy przyosiowej, różniącą się od powszechnie stosowanego oznaczania somitów liczbami według kolejności ich powstawania. Poszczególne somity zostały



RYCINA 2. Schemat struktury komórkowej mezodermy przedsomitowej zarodka kury, oznaczenia poziomów wg Pourquie i Tam [60] jak na ryc. 1



RYCINA 3. Schemat cyklicznej ekspresji genu *c-hairy 2* w ciągu 90 minut na przykładzie tworzenia się 15 i 16 kolejnego somitu u zarodka kury

przez nich ponumerowane cyframi rzymskimi zgodnie z ich położeniem wzdłuż osi A/P, poczynając od pierwszego ostatnio utworzonego somitu oznaczonego jako SI. W ten sposób numer somitu określa jego stan zróżnicowania, a nie położenie na osi A/P. PSM została podzielona na prospektywne somity (presomity) oznaczone S0, S-I, S-II, S-III itd. Prospektywne granice między nimi oznaczono odpowiednio literą B z numeracją arabską, np. prospektywną granicę między S0 a S-I jako B-1 (ryc. 1 i 2).

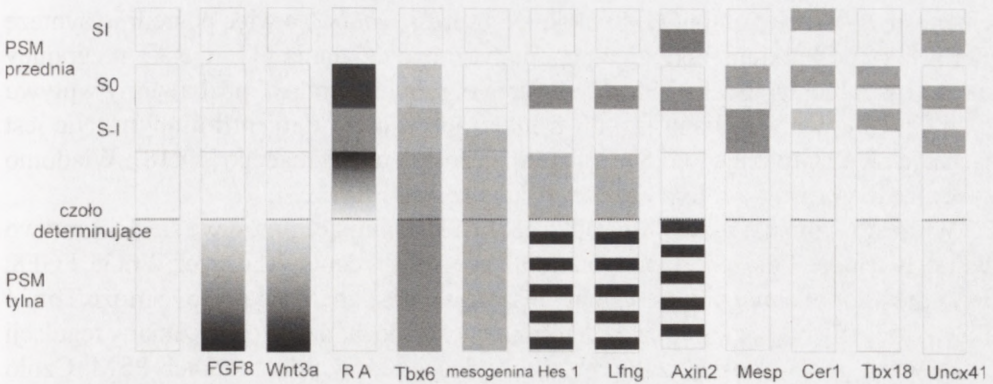
Komórki PSM są ukierunkowane na wytworzenie somitu i każda komórka w kohorcie przechodzi przez kolejne fazy różnicowania się od komórki macierzystej do komórki wykształconego somitu. Nie są one jednak jeszcze całkowicie zdeterminowane i są pluripotentne. Komórki PSM, wszczepione do młodszego zarodka, są zdolne do różnicowania się w boczną mezodermę, śródbłonek i endodermę [76].

## CZYNNIKI MOLEKULARNE W PSM

Podział PSM na rostralną i kaudalną, początkowo czysto morfologiczny znalazł potwierdzenie w odmiennym rozmieszczeniu w niej niektórych czynników wzrostowych oraz odmiennej ekspresji genów. Najważniejszą jednak właściwością kaudalnej PSM oraz pęczka ogonowego jest powtarzająca się regularnie aktywacja i zahamowanie ekspresji niektórych genów w ramach zegara oscylacyjnego.

W całej PSM ulegają ekspresji geny czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla mezodermy *Tbx*, *evx* (*even shipped*), *caudal*, *brachyury T* [59, 81]. Tylna PSM u wszystkich kręgowców charakteryzuje się aktywnością konserwatywnych genów, takich jak: *fgf8*, *wnt3a*, *brachyury T*, *mezogenin*, *mespo*, *tbx6*. Białko *Tbx6*, występujące w smudze pierwotnej, pęczku ogonowym i całej PSM, bierze udział w początkowym ukierunkowaniu komórek tych struktur w komórki mezenchymatyczne.





RYCINA 4. Schemat ekspresji niektórych genów w mezodermie przedsomitowej – PSM i somicie SI u zarodka myszy, cykliczna ekspresja zaznaczona prążkowaniami

Mutanty myszy pozbawione genu *tbx6* mają somity zmienione w dodatkowe cewy nerwowe [80]. W rostralnej PSM wykrywa się obecność kwasu retinowego i białek transkrypcyjnych *Mesp* (*mesoderm posterior*), *Foxc* (*Forkhead/winged helix transcription factor*) i *paraxis* [18,77].

Czynniki wzrostowe FGF8 (*fibroblast growth factor 8*) i Wnt3a (*Wingless integrated 3a*) występują w kaudalnej PSM w gradiencie zmniejszającym się rostralnie (ryc. 4). Obydwa te czynniki są wytwarzane w smudze pierwotnej oraz w pączku ogonowym i dyfuzyjnie rozchodzą się dogłowowo w PSM. Transkrypcja ich zostaje zahamowana, kiedy komórki z pączka ogonowego przesuwane są do PSM. FGF8 działa za pośrednictwem kaskady kinaz MAPK (*mitogen activated protein kinase*) [64], a Wnt3a poprzez szlak kanoniczny z udziałem kateniny  $\beta$  i GSK-3 (kinazy syntazy glikogenowej 3) [4]. Zawartość FGF8 i Wnt3a i ich mRNA zmniejsza się na skutek rozpadu transkryptu, stąd w PSM ustala się ich gradient malejący dogłowowo [3,18]. Przypuszcza się, że istnieje współzależność działania FGF8 i Wnt 3a, przy czym FGF8 wzmacnia sygnalizację Wnt3a [3]. W kaudalnej PSM danio sygnalizacja FGF8/MAPK utrzymuje komórki w stanie niedojrzałym, nie wpływając na ich proliferację i migrację [64]. U myszy gra podobną rolę Wnt3a [23].

Szereg obserwacji wskazuje, że zasięg rozmieszczenia FGF8 jest ograniczony przez kwas retinowy – RA (ryc. 4). RA jest trudny do bezpośredniej lokalizacji w tkankach i komórkach. Proporcjonalnie do syntezy uwalniany z komórki dyfunduje na duże odległości oraz jest szybko metabolizowany przez różnego rodzaju komórki [46]. Na rozmieszczenie RA w tkankach pośrednio wskazuje lokalizacja enzymów związanych z jego metabolizmem. W somitach wykrywa się enzym *Raldh2*, który bierze udział w wytwarzaniu RA. W niższym stopniu występuje ten enzym w rostralnej PSM. Natomiast w pączku ogonowym czynny jest *Cyp 26*, enzym związany z katabolizmem RA [23, 62]. Można więc przypuszczać, że RA tworzy w PSM gradient malejącym doogonowo [46]. Uważa się, że RA i FGF działają antagonistycznie wobec siebie. RA hamuje

ekspresję *fgf8* i odwrotnie FGF8 blokuje ekspresję *raldh2*, a więc pośrednio syntezę RA [18, 62]. Skutkiem takiego antagonistycznego działania FGF i RA, na granicy części rostralnej i kaudalnej PSM powstaje obszar „neutralny” pozbawiony wpływu tych czynników. Nazywany jest on frontem lub **czołem determinującym**. Nie jest jasne, jak RA stabilizuje FGF8 na poziomie czoła determinującego [17,18]. Wiadomo tylko, że RA odgrywa rolę w dojrzewaniu komórek PSM [23].

W czasie wzrostu i rozwoju zarodka czoło determinujące przesuwa się doogonowo w stałym tempie. Położenie czoła determinującego jest regulowane przez Wnt3a, FGF8, RA i prawdopodobnie przez nieznaną jeszcze szlak sygnalizacyjny, być może Tbx24 [23, 51, 53, 65]. Na poziomie czoła determinującego dochodzi do ostrej zmiany regulacji i aktywacji genów, zostaje zatrzymana oscylacja genów w komórkach PSM. Czoło determinujące oddziela dwa etapy somitogenezy, przebiegające inaczej w kaudalnej niż w rostralnej PSM; rozgranicza komórki niekompetentne od kompetentnych do pełnego realizowania programu somitogenezy. Najważniejszą właściwością kaudalnej PSM oraz pęczka ogonowego jest powtarzająca się regularnie aktywacja i zahamowanie ekspresji niektórych genów w zegarze oscylacyjnym.

## ZEGAR OSCYLACYJNY

Już bardzo dawno zauważono, że nowa para somitów regularnie powstaje w stałych, określonych odstępach czasu i przyjęto określanie stanu rozwoju (wieku) zarodka według liczby widocznych par somitów. Tę periodyczność próbowano wytłumaczyć proponując różne teoretyczne modele somitogenezy. Między innymi Cooke i Zeemane w 1976 [13] zakładali, że komórki PSM periodycznie przechodzą ze stanu receptywności (zdolności odpowiedzi) do stanu niereceptywności. Zmiany te przesuwały się przez PSM od tyłu ku przodowi na kształt fali. Teoria ta w sposób znaczący zaważyła na sposobie opisu i interpretacji wyników badań molekularnych nad somitogenezą.

Periodyczną ekspresję genów w PMS po raz pierwszy opisali Palmeirini i wsp. [57] w 1997 r. badając rozmieszczenie mRNA *c-hairy* w kolejnych stadiach rozwoju somitów w zarodku kury. Od tego czasu posypały się doniesienia o innych genach wykazujących periodyczną ekspresję w kaudalnej PSM zarodków kręgowców. Nazwano je genami oscylacyjnymi. Ze względu na regularnie trwające i powtarzające się okresy aktywacji i zahamowania ekspresji tych genów, mechanizm, w jakim one funkcjonują, nazwano **zegarem oscylacyjnym** lub **zegarem somitogenetycznym**. Mechanizm działania zegara oscylacyjnego jest jak dotychczas tylko częściowo poznany. Wykryte geny oscylujące w kaudalnej PSM kręgowców przedstawiono w tabeli I.

Ekspresję genów oscylacyjnych najczęściej bada się w zarodkach *in toto*. W miejscach ekspresji genu występuje jego transkrypt – mRNA, który uwidocznic można odpowiednimi metodami. Badane mRNA występuje w PSM w postaci jednego, dwóch lub trzech prążków leżących w poprzek osi A/P zarodka (ryc. 3). Każdy prążek odpowiada innej kohorcie komórek w innym stadium somitogenezy. Ponieważ kolejne pulsy ekspresji rozpoczynają się na kaudalnym końcu PSM co stale określony period



w nowej kohorcie dołączanej do PSM, w zarodkach obserwowanych *in toto* prążki sprawiają wrażenie jakby przesuwały się przez PSM w czasie kolejnych faz rozwoju zarodka. Liczba prążków widocznych równocześnie w PSM zależy także od tempa zaniku transkrypty w kohorcie. Jeszcze raz podkreślić trzeba, że komórki różnicującej się kohorty „stoją w miejscu” i w każdej kohorcie zachodzi kolejno pulsacja ekspresji genów i wszystkie dalsze etapy somitogenezy.

Wykazano, że oscylacja ekspresji genów jest w wysokiej mierze autonomiczna w kohorcie i w niewielkim stopniu zależy od czynników zewnętrznych. Izolowane, małe wycinki kaudalnej PSM kury i myszy hodowane *in vitro* wykazują oscylacyjną ekspresję genów, co najmniej przez kilka cykli oscylacyjnych. Natomiast pojedyncze komórki PSM tych zwierząt hodowane w zawieszynie (a więc niekontaktujące się ze sobą) mają zaburzoną i nieregularną ekspresję genów [47, 49]. Oscylacja ekspresji genów zachodzi równocześnie we wszystkich komórkach kohorty, co wskazuje że musi istnieć mechanizm pozwalający na synchronizację tego procesu w obrębie kohorty. Taki mechanizm może opierać się na połączeniach międzykomórkowych szczelinowych (*nexus*), cząsteczkach adhezyjnych na powierzchni komórek, a także na takim systemie sygnalizacji, który działając w jednej komórce powoduje takie same zmiany w komórce sąsiedniej. Co raz więcej jest dowodów, że mechanizm zegara oscylacyjnego ma za podstawę także molekularne negatywne pętle sprzężenia zwrotnego. Negatywna pętla sprzężenia zwrotnego (*negative feedback loop*) jest mechanizmem, w którym ekspresja genu jest hamowana przez białko kodowane przez ten gen. Warunkom tym odpowiada system sygnalizacyjny Notch, który ponadto może być regulowany przez poziom FGF8 i Wnt3a. Wykazano rzeczywiście, że system sygnalizacyjny Notch leży u podstaw oscylacji genów w kaudalnej PSM, a następnie odgrywa istotną rolę w tworzeniu granicy między somitami i polaryzacji somitu.

Istotna funkcja sygnalizacji Notch w PSM polega prawdopodobnie na utrzymaniu synchronizacji oscylacji w sąsiadujących komórkach [23]. Można także przypuszczać, że sygnalizacja Notch odgrywa rolę w rozgraniczaniu poszczególnych puli komórek macierzystych emigrujących z pączka ogonowego. Sygnalizacja Notch jest bowiem także mechanizmem, który pozwala na odmienną ekspresję genów w dwóch sąsiadujących komórkach i skierowanie ich na inne drogi różnicowania.

Warto może przypomnieć krótko, jak funkcjonuje sygnalizacja Notch (zwana także Delta/Notch). Działa ona między co najmniej dwoma komórkami w jakiś sposób kontaktującymi się ze sobą. Zarówno bowiem ligandy Delta, jak i receptory Notch są białkami błonowymi, mającymi domeny tak pozakomórkowe, jak i śródkomórkowe. Szczególną właściwością tego szlaku jest to, że komórka może równocześnie produkować receptor i ligand. Zależnie od przewagi produkcji białka Notch lub Delta komórka działa jako receptorowa lub jako nadająca sygnał. Po związaniu się liganda z receptorem od domeny śródkomórkowej Notch zostaje odcięty drogą proteolityczną odcinek NICD, który przemieszcza się do jądra komórkowego wraz z czynnikiem transkrypcyjnym Su(H) (*Suppressor of Hairless*), u ssaków RBJk (*Recombination signal sequence binding Protein for JK*) z rodziny bHLH i aktywuje transkrypcję genów *Hairy/E (spl)* (*Hairy and Enhancer of split*). Te ostatnie, z rodziny białek z domeną bHLH, działają jako czynniki transkrypcyjne regulujące aktywność wielu genów. Białka *Hairy/*

En(spl) hamują ekspresję genu *delta* i równocześnie zwiększają produkcję białka Notch. Komórka staje się wtedy odbiorcą sygnałów. Jeżeli natomiast gen *Hairy/En(spl)* zostanie zablokowany, wzrasta produkcja białka Delta i komórka przemienia się w sygnalizacyjną. Poznano wiele białek należących do rodziny *Hairy/En(spl)*, np. u danio wyizolowano ich co najmniej 14 [69]. Mają one zdolność tworzenia homo- i heterodimerów [58]. Uważa się, że różne ich kombinacje, współdziałając z białkiem Su(H) odpowiadają za plejotropowe działanie systemu Notch. Sygnalizacja Notch jest również regulowana przez endocytozę liganda i receptora przy udziale ubikwityny [45]. Sygnalizacja Notch bierze udział w wielu procesach komórkowych zachodzących w rozwoju zarodkowym kręgowców i bezkręgowców, zwłaszcza prowadzących do odmiennego zachowania się sąsiadujących ze sobą komórek. Wiemy, że jest odpowiedzialna za tzw. boczne hamowanie mitozy, za odmiennie różnicowanie się sąsiednich komórek (*lateral specification*).

Czy zegar oscylacyjny działa jednakowo u wszystkich kręgowców, nie wiadomo. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na różnice między gromadami. U ryb regulacja działania zegara, jak się wydaje, jest prostsza niż u ptaków, a najbardziej skomplikowana jest u ssaków. Być może za mało jeszcze wiemy na ten temat.

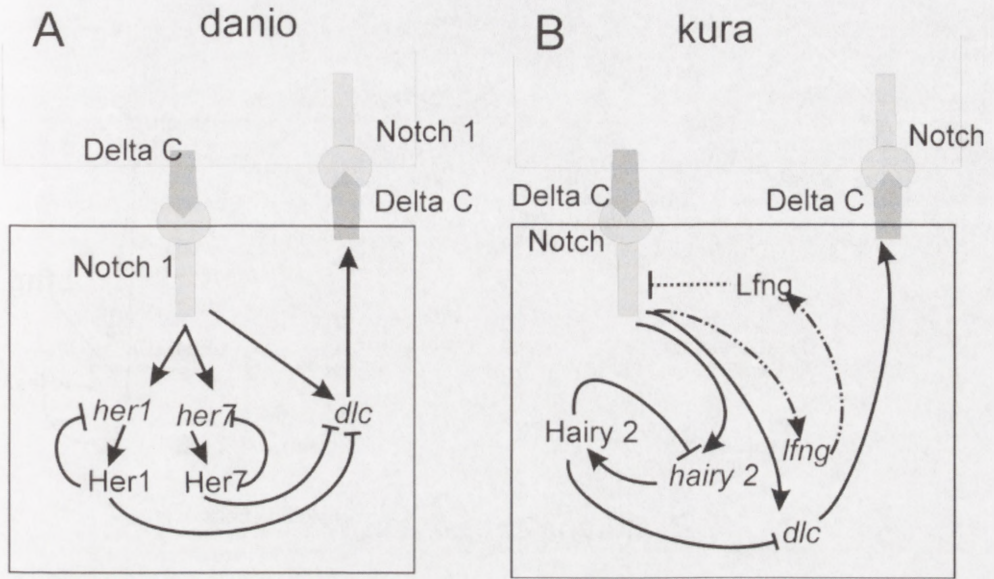
Mechanizm zegara oscylacyjnego funkcjonującego w kaudalnej PSM i pączku ogonowym zarodka danio został stosunkowo dobrze zbadany. Jak już wyżej zaznaczono, rdzeniem mechanizmu zegara jest sygnalizacja Notch. Oscylują w niej geny *deltaC* oraz *her1*, *her7* i *her11*, należące do rodziny *Hairy/E(spl)* (tab. I). *Notch1* ma stałą, nieoscylacyjną ekspresję w całej PSM. Według Holley i współautorów [33,34] ligand DeltaC łącząc się z Notch1 powoduje ekspresję genu *her1* i *her7*, które kodują białka Her1 i Her7. Powstające białka Her hamują z kolei ekspresję genu *deltaC* i swoich własnych genów *her1* i *her7* (ryc. 5 A). Zahamowanie ekspresji tych genów trwa, dopóki Her1 i Her7 są obecne w komórce. Białka te są stopniowo degradowane przy udziale ubikwityny i proteasomów. W ten sposób tworzy się samoregulująca się, molekularna pętla sprzężenia zwrotnego, powodująca cykliczną ekspresję wymienionych genów.

Rola poszczególnych białek Her i ich wzajemne współdziałanie nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Lokalizacja ekspresji genów *her1*, *her7* i *her11* jest jednakowa. Nie jest jasne, jaka jest współzależność tych genów. Wykazano tylko, że białka Her1 i Her7 działają odmiennie. Her7 potrzebne jest dla rozpoczęcia oscylacji *her1* w pączku ogonowym, bowiem mutanty danio pozbawione genu *her7* wykazują stałą (ciągłą) nieoscylacyjną ekspresję *her1*. Her1 i Her7 odgrywają również odmienną rolę w dalszej somitogenezie przy tworzeniu się granic między somitami (o czym niżej). Gen *her1* ma prawdopodobnie co najmniej dwa odmiennie elementy regulacyjne w promotorze, jeden już wykryty jest

TABELA I. Geny o cyklicznej ekspresji w przed-somitowej mezodermie zarodków danio, kury i myszy

Danio	Kura	Mysz
<i>her1</i> [33,34]	<i>hairy 1</i> [56]	<i>hes 1</i> [37]
<i>her7</i> [55]	<i>hairy 2</i> [37]	<i>hes 7</i> [5,6]
<i>delta c</i> [33]	<i>hey 2</i> [23,59]	<i>hey 2</i> [23,59]
	<i>lfng</i> [27]	<i>Lfng</i> [22]
		<i>axin 2</i> [4]
		<i>ndk 1</i> [35]



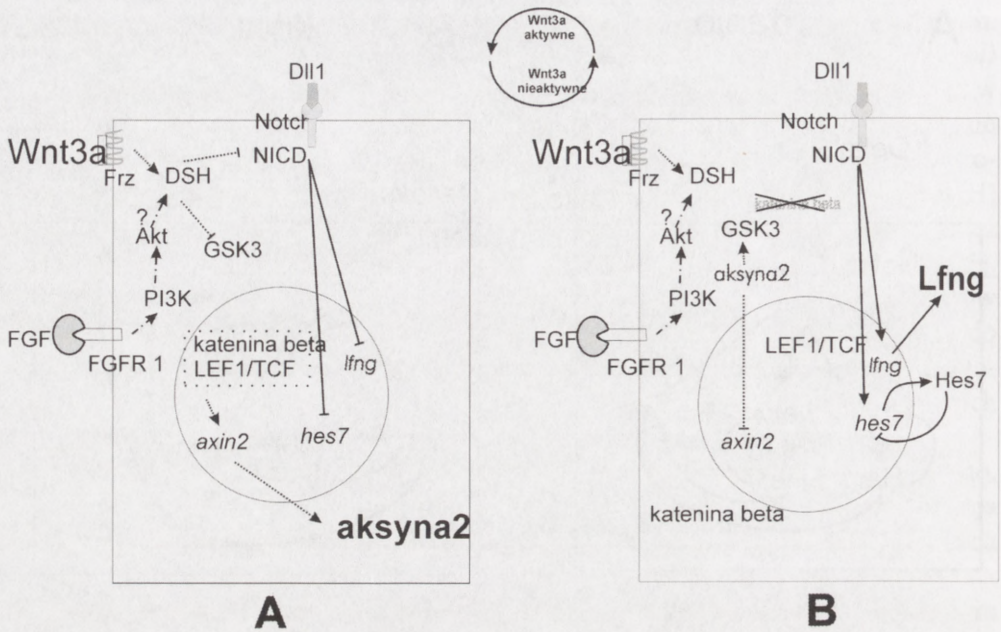


RYCINA 5. Schemat działania zegara oscylacyjnego: A – u zarodka danio, B – u zarodka kury; sygnalizacja Notch zaznaczona ciągłą kreską, pętla sprzężenia zwrotnego z udziałem *Lfn1* kreską przerywaną

odpowiedzialny za ekspresję w pączku ogonowym (kaudalnej PSM), drugi hipotetyczny za ekspresję w rostralnej PSM [25]. Większość autorów uważa, że Her1 działa jako represor podobnie jak inne białka z rodziny Hairy/En(spl) [34, 55], natomiast Gajewski i współautorzy [25] przypisują mu rolę aktywatora, który działa za pośrednictwem dodatkowego czynnika. Rola oscylującego genu *her11* jest nieznana [69]. W mezodermie przyosiowej danio obok wymienionych wyżej genów z rodziny *Hairy/E (spl)* wykryto w somitogenezie ekspresję kilkunastu innych nieoscylujących genów z tej samej rodziny, o niewyjaśnionej funkcji. Mogą one współdziałać z genami oscylującymi, wiadomo bowiem, że geny z tej rodziny działają w sygnalizacji Notch jako homo- lub heterodimery [33, 34]. Geny nieoscylujące *her4* i *her6* ulegają wczesnej i przejściowej ekspresji w pączku ogonowym, wykazano, że odpowiadają one za synchronizację komórek w kohorcie. Ich mRNA jest prawdopodobnie produkowane w takiej ilości, która wystarcza dla synchronizacji całej kaudalnej PSM przez kilka cykli oscylacyjnych [58].

Sama aktywność sygnalizacji Notch nie determinuje zegara oscylacyjnego. W regulację zegara oscylacyjnego u danio jest włączony szlak sygnalizacyjny FGF [23] oraz zapewne wiele innych czynników jeszcze niewykrytych.

U zarodków kury i myszy do regulacji działania zegara oscylacyjnego włącza się białko *Lfn1* (*Lunatic fringe*) [12, 66]. Białko to moduluje powinowactwo receptora Notch do ligandów, działając jako glikozylotransferaza. U zarodków kury oscylującymi genami są *hairy 1*, *hairy 2* i *hey 2* z rodziny *Hairy/E (spl)* oraz *lfn1* (tab. I). Czynnikiem regulującym molekularną pętlę sprzężenia zwrotnego jest białko Hairy2 [27, 36, 47] (ryc. 5 B). U ptaków i ssaków gen kodujący ligand Delta nazwany jest *dll* (*delta*



RYCINA 6. Schemat działania zegara oscylacyjnego w kaudalnej PSM myszy według koncepcji Aulehla i Herman [3] oraz Galceran i współautorów [23]: A – Wnt3a wiążąc się z receptorem Frz powoduje wejście kateniny  $\beta$  związanej w kompleksie z LEF1/Tcf do jądra komórkowego, oddziaływanie tego kompleksu z DNA i aktywację ekspresji genu *axin2*. W cytoplazmie gromadzi się białko aksyna 2. Równocześnie DSH wiąże się z NICD odciętym od receptora Notch i blokuje dalsze etapy sygnalizacji Notch w tym aktywację genów *hes 1*, *hes 7* i *lfng* (Wnt3a aktywne – Notch nieaktywne); B – Następnie nagromadzona w komórce aksyna 2 wiąże się z GSK3, przez co blokuje wejście kateniny  $\beta$  do jądra komórkowego, co powoduje zahamowanie sygnalizacji Wnt3a i w konsekwencji hamuje syntezę nowej aksyny. Równocześnie DSH uwalnia związany uprzednio NICD, dzięki czemu odblokowana zostaje sygnalizacja Notch i syntetyzowane są białka Hes1, Hes7 oraz Lfng (Wnt3a nieaktywne – Notch aktywne). Aksyna związana z GSK3 ulega degradacji i sygnalizacja Wnt3a zostaje ponownie aktywowana i cykl rozpoczyna się na nowo. Sygnalizacja Wnt3a pozostaje pod stałą kontrolą FGF8, który transdukuje sygnał przez receptor FGFR1 oraz kinazę PI3k i Akt. Mechanizm oddziaływania Akt na GSK-3 jest niejasny. Szlaki sygnalizacyjne zaznaczone: Notch linią ciągłą, Wnt3a linią kropkowaną, FGF8 linią przerywaną

*like*). Ekspresja genu *dll1* u ptaków jest regulowana także przez białka Brachyury-T i Tbx 26 oraz niezależnie od nich bezpośrednio przez WNT3a [31].

U zarodków myszy w kaudalnej PSM oscylują geny: *hes 1*, *hes 7* z rodziny *Hairy/E (spl)* oraz *lfng* i *axin 2* (tab. I). Ekspresja *hes 7*, podstawowego czynnika sygnalizacji Notch, kontrolowana jest przez negatywne sprzężenie zwrotne. Cykliczna ekspresja tego genu zachodzi co 2 godziny, koreluje to z powstawaniem co 2 godziny nowego somitu. Długość fazy cyklu zegara jest zależna od okresu półtrwania białka Hes7, który u dzikich myszy wynosi około 22 minuty. Synteza Hes7 jest prawdopodobnie opóźniona o 30 minut w stosunku do syntezy jego mRNA [5]. Białko Hes7 jest degradowane przez system ubiquityna - proteasomy. Uzyskano mutanty o wydłużonym okresie półtrwania Hes do około 30 minut, u których zegar oscylacyjny i segmentacja



somitów były zaburzone po kilku normalnych cyklach oscylacyjnych. Zrobiono symulację matematyczną oscylacji *hes7* i wykazano, że dla utrzymania oscylacji i funkcji zegara oscylacyjnego istotna jest niestabilność Hes7 [5, 30]. Białko Hes7 hamuje ekspresję swojego genu i genu *lfng* oraz jest istotne dla regulacji ekspresji *hes 1* i *hey 2* (rys. 6 B). Tak samo jak ekspresja *hes7* oscyluje ekspresja *hes 1* [5].

*Lfng* ulega ekspresji zarówno w kaudalnej, jak i rostralnej PSM myszy, ale oscyluje tylko w kaudalnej PSM, natomiast w rostralnej PSM ekspresja jest stała. Oscylacyjna ekspresja *lfng* odbywa się synchronicznie z ekspresją *hes7*. Kolejne „fale” nakładają się w czasie, ale nie przestrzennie, rozpoczynają się na kaudalnym końcu PSM co 2 godziny. (Stąd na PSM badanej *in toto* występuje równocześnie dwa lub trzy prążki) [22]. Cytoplazmatyczny transkrypt jest niestały i szybko rozpada się po ustaniu syntezy. Szereg różnych czynników reguluje periodyczność ekspresji *lfng* w zegarze oscylacyjnym. Ekspresja *lfng* nie oscyluje w razie braku aktywności sygnalizacji Notch [50]. Wykazano, że u zarodków myszy i człowieka gen *lfng* jest odmiennie regulowany w kaudalnej i rostralnej PSM [50]. W 2003 r. ukazały się jednocześnie w tym samym numerze czasopisma dwie prace na ten temat. Morales i współautorzy [50] stwierdzili, że promotor *lfng* zawiera kilka elementów regulujących:

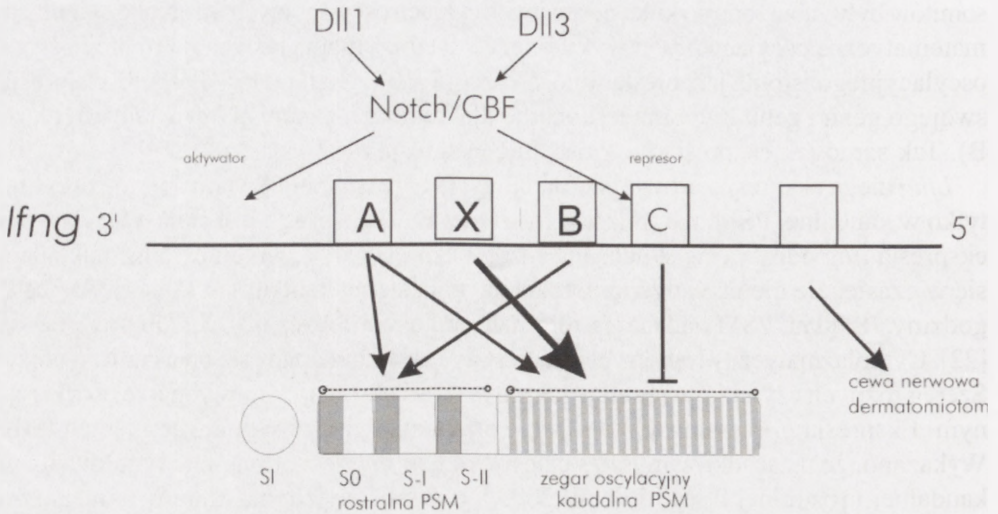
1. blok A wystarczający dla ekspresji *lfng* w rostralnej PSM i konieczny dla cyklicznej ekspresji *lfng* w kaudalnej PSM;
2. blok B wystarczający i prawdopodobnie konieczny dla ekspresji w rostralnej PSM;
3. blok C potrzebny dla represji w PSM;
4. blok X potrzebny dla wysokiej ekspresji w kaudalnej PSM;
5. blok regulujący ekspresję w cewie nerwowej i dermatomiotomie (ryc. 7).

Pozytywne i negatywne impulsy wymagane do cyklicznej ekspresji działają poprzez odmiennie miejsca w promotorze. Natomiast Cole i współautorzy [12] wykazali, że promotor *Lfng* ma dwa odrębne elementy regulatorowe. Jeden kieruje oscylacją *lfng* w kaudalnej PSM, a drugi reguluje ekspresję *lfng* w rostralnej PSM i wpływa również na precyzyjne działanie zegara oscylacyjnego. W rejonie pierwszym jest miejsce wiążące białka Hes oraz czynnik transkrypcyjny Su(H)/ Rbp-Jk powodujące represję ekspresji *lfng*.

Komórki kaudalnej PSM myszy przechodzą w ciągu trwającej somitogenezy przez szereg cykli oscylacyjnych, w których na przemian aktywne są szlaki Wnt i Notch. Ze względu na malejący kaudalno-rostralny gradient stężenia WNT3a w kaudalnej PSM w każdym kolejnym cyklu aktywność WNT jest słabsza niż w poprzednim i wygasa na poziomie czoła determinującego, w którym zegar oscylacyjny zostaje zatrzymany. Na tym poziomie sygnalizacja Notch stabilizuje się i zostaje wzmocniona ekspresją genów związanych z tworzeniem granic i polarności somitu [3, 4].

Sygnalizację Notch z sygnalizacją Wnt3a, obok DSH (*Dishewelled*) oraz LEF1/TCF (*Lymphoid enhancer binding factor/-T-cell factor*)<sup>2</sup> łączy także aksyna 2. W kaudalnym PSM myszy gen *lfng* ulega ekspresji na przemian z oscylacyjną ekspresją genu *axin2* [3, 4, 59].

<sup>2</sup>DSH jest białkiem pośredniczącym w transdukcji sygnału Wnt w cytoplazmie, wiąże się między innymi z kinazą GSK3 i hamuje jej aktywność, przez co blokuje rozpad kateniny  $\beta$  i powoduje jej nagromadzenie w jądrze komórkowym, tu katenina  $\beta$  wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym LEF /TCF [43].



RYCINA 7. Schemat promotora genu *lfng*, miejsca [bloki] regulatorowe zaznaczone kwadratami, strzałki wskazują poziomo na PSM podlegające regulacji danego miejsca, na podstawie Cole i współautorów [11] i Morales i współautorów [49]

Aulehla i współautorzy [4] zaproponowali następujący model cyklicznej, naprzemiennej aktywacji i wzajemnej regulacji szlaków Wnt3a i Notch w kaudalnej PSM u zarodka myszy (ryc. 6). Wnt3a wiąże się z receptorem Frz (*Frizzled*) i aktywuje szlak kanoniczny [43], w którym białko adaptorowe DSH wiążąc się z kinazą Gsk3 blokuje jej aktywność. Na skutek tego nie dochodzi do degradacji kateniny  $\beta$ . Przemieszcza się ona z cytoplazmy do jądra komórkowego i za pośrednictwem białek transkrypcyjnych TCF/LEF wiąże się z DNA. Zostaje aktywowana transkrypcja genu *axin 2* i aksyna 2 gromadzi się w cytoplazmie. Aksyna 2 z kolei aktywuje GSK 3, przez co powoduje rozpad kateniny  $\beta$ . Ponieważ nie dochodzi do przemieszczania się kateniny  $\beta$  do jądra komórkowego, transdukcja szlaku Wnt3a zostaje zablokowana. Zachodzi negatywne sprzężenie zwrotne między Wnt3a a aksyną. Aksyna 2, tak jak jej transkrypt, jest wysoce niestabilna, jest ona destabilizowana przez fosforylację. Wnt3a jest stale obecne w substancji międzykomórkowej kaudalnej PSM, ale dopiero periodyczne pojawianie się i zanikanie aksyny 2 powoduje pulsacyjne aktywowanie sygnalizacji Wnt3a w komórkach kaudalnej PSM. Aksyna 2 pośrednio blokuje również sygnalizację Notch. Bowiern po związaniu się Wnt3a z receptorem Frz, DSH wiąże się także z odcięty od Notch odcinkiem NICD (patrz str. 401) i hamuje cytoplazmatyczne etapy szlaku Notch (Wnt aktywne – Notch nieaktywne *Wnt on* – *Notch off*) (ryc. 6 A). W takiej sytuacji w cytoplazmie gromadzi się aksyna 2 i hamuje działanie Wnt3a. Równocześnie NICD zostaje uwolniony ze związania z DSH i sygnalizacja Notch zostaje przywrócona i uruchomiona jest ekspresja *lfng* (Wnt nieaktywne – Notch aktywne *Wnt off* – *Notch on*) (ryc. 6B). Tak więc na skutek naprzemiennej aktywacji sygnalizacji Wnt3a i Notch w komórkach kaudalnego PSM oscylują na przemian geny *axin 2* i *lfng* [4]. Efektywność działania WNT3a według tego modelu zostaje wzmocniona przez FGF8, które za pośrednictwem kinaz PI-3 (1,4,5-trifosforanu inozytolu) i Akt blokuje GSK 3 [3, 4].



Zależności pomiędzy sygnalizacjami Wnt3a i Notch są prawdopodobnie bardziej skomplikowane, gdyż wykazano, że promotory genów *dll1* i *notch* mają kilka miejsc wiążących LEF1/TCF, ponadto stwierdzono, że kompleks LEF1/TCF - katenina  $\beta$  indukuje ekspresję *dll1* oraz *axin2* [26].

Rola zegara oscylacyjnego nie jest w pełni wyjaśniona. Może on służyć do koordynowania periodycznej aktywności sygnalizacji Notch w PSM, która prowadzi ostatecznie do rytmicznej determinacji granic somitów i wyodrębnienia w nich przedniej i tylnej części. Ponieważ komórki PSM zapamiętują liczbę pulsacji, przez jaką przeszły w części kaudalnej, nim weszły w skład somitu, liczba oscylacji może być związana z informacją pozycyjną (o czym niżej) [23]. Zegar odgrywa także rolę w zapoczątkowaniu synchronizacji rozwoju somitów po prawej i lewej stronie zarodka [59].

## ROSTRALNA PSM

W rostralnej części PSM następuje wydzielenie się presomitów, epitelizacja komórek presomitów, rozpoczęcie ich polaryzacji w osi A/P oraz tworzenie się granic między somitem a PSM. Są to zmiany prowadzące do segmentacji. Rostralnie od czoła determinującego ustaje oscylacyjna ekspresja genów zegara oscylacyjnego. Stabilna ekspresja tych genów zachodzi w S-I i S0 (ryc. 3). Zanik oscylacji wiąże się z pojawieniem się w komórkach rostralnej PSM u wszystkich przebadanych kręgowców białek *Mesp* i *Foxc*, a u danio także białek *Fss* i *Tbx24* [51].

Białka *Mesp* (*Mesoderm posterior*) to: *Mesp1* i *Mesp2* u myszy, *c-Mesol* u kury, *Mesp-a* i *Mesp-b* u danio. Są to czynniki transkrypcyjne z podrodziny bHLH [64]. *Mesp* zmienia aktywność receptora Notch. Równocześnie z wystąpieniem ekspresji *mesp* w rostralnej PSM zahamowana zostaje pulsacja *lfng*. Następuje zmiana w regulacji ekspresji genu *lfng*, który aktywowany jest tu poprzez inną domenę regulacyjną niż w kaudalnej PSM [12, 50, 51] (ryc. 7). Ekspresja genów *mesp* w czasie somitogenezy zachodzi u wszystkich przebadanych kręgowców w całym S-1, a w rostralnej części S0 pozostaje u danio ekspresja *mesp-a*, a u myszy *mesp2* [64, 73]. Białka *Mesp* są związane z tworzeniem się granicy między somitami oraz z determinacją polarnośći A/P somitu (patrz dalej). Uważa się, że *Mesp* odpowiada za „przetłumaczenie” zegara oscylacyjnego na liniowe ułożenie somitów [18].

Zarówno u danio, jak i u myszy w rostralnej PSM i nowowytworzonych somitach aktywne są geny *foxc1a* i *foxc1b* z rodziny forkhead (*Forkhead/winged helix transcription factor*). Białka *Foxc* odgrywają zasadniczą rolę w tworzeniu somitu, regulując w rostralnej PSM ekspresję wielu genów, takich jak: *mesp1*, *mesp2*, *hes5*, *notch1*, *dll1*, *lfng*, *paraxis* [18, 44]. Zahamowanie bowiem syntezy białka *Foxc1a* u danio blokuje oddzielanie się somitu od PSM i polaryzację somitu, powoduje zanik ekspresji *mesp-b*, *ephrinB2*, *epHA4*, *Notch5* i *Notch6* oraz *paraxis*, zaburza także ekspresję *dll12* i *lfng*. Normalna pozostaje ekspresja *mesp-a*, *papc*, *deltaC* i *deltaD* [18]. *Foxc* może działać jako permisywny sygnał dla programu segmentacyjnego [18, 77].

Jak wyżej zaznaczono, u danio w rostralnej PSM ulegają ekspresji geny *fss* i *Tbx24*. Przypuszcza się, że FSS i Tbx24 działają w końcowym etapie segmentacji. Białko Fss (*fussed somites*) pobudza ekspresję *mesp-a* i *mesp-b* oraz genów markerów rostralnej części somitu, to jest *papc*, *fgfr1*, *notch6*, a hamuje ekspresję markerów kaudalnych: *myoD* i *notch5*, *efryna A1* [64]. U mutantów *fss null* zanika polaryzacja somitów i granice pomiędzy somitami, dochodzi do ich fuzji (stąd pochodzi nazwa tego genu).

Gen *Tbx24*, ulega ekspresji w dojrzewających komórkach środkowej i rostralnej PSM, z granicą na rostralnej krawędzi S0. Presomitowe komórki utrzymują tę ekspresję aż do zakończenia tworzenia granicy segmentu. Gen *Tbx24* koduje białko odbiegające nieco od innych białek z rodziny Tbx [52]. Tbx24 jest istotnym czynnikiem dojrzewania komórek PSM prowadzącym do stanu, w którym zachodzi indukcja ekspresji *mesp* i zatrzymanie oscylacji *her1*. Tbx24 działa w procesie tworzenia granic między somitami. Zahamowanie działania Tbx24 przez wstrzyknięcie morfolino *Tbx24* do zarodka wstrzymuje całkowicie segmentację i daje fenotyp podobny do mutacji *fss null*. Nikaido i współautorzy [53] wykazali znaczne podobieństwo białka Tbx24 do białka Fss i sugerują, że koduje je jeden gen, być może jest to *fss* lub że białko Tbx24 jest kodowane w ramach szlaku sygnalizacji Fss.

U danio w rostralnej PSM ulega ekspresji gen *Gadd45* (*growth and DNA damage*) Jest ona ściśle regulowana, bowiem nadekspresja lub nokaut tego genu powodują zaburzenia w segmentacji [40].

## EPITELIZACJA PSM

W części rostralnej PSM zachodzi równocześnie epitelizacja komórek i polaryzacja przysłego somitu. Uważa się, że FGF8 blokuje epitelizację w kaudalnej PSM, a w rostralnej stymuluje ją *Mesp1* [7, 59, 72].

Proces epitelizacji jest częściowo autonomiczny, a częściowo indukowany przez przyległą do PSM ektodermę powierzchniową. Rozpoczęcie jego zbiega się z pojawieniem się w PSM u danio białka Tbx24, a u kury białka *paraxis*, czynnika transkrypcyjnego z rodziny bHLH. *Paraxis* uważane jest za znaczące w indukcji procesu epitelizacji [15, 52, 59]. W komórkach PSM wytwarzana jest integryna  $5\alpha$ , wydzielana jest fibronektyna [38,41]. Ważną rolę w zmianie kształtu komórek mezenchymatycznych w nabłonkowate w czasie epitelizacji u zarodka kury odgrywają białka *Cdc42* (*cell division cycle 42 = GTP binding protein*) i *Rac1*. Są to GTPazy z rodziny Rho wpływające między innymi na cytoszkielet komórki poprzez zmiany polimeryzacji aktyny. „Decyzja” komórki, czy ma pozostać mezenchymatyczną czy przekształcić się w nabłonkową, zależy od poziomu w niej *Cdc42*. Przy wysokim poziomie komórka pozostaje mezenchymatyczną z licznymi wypustkami, przy niskim traci wypustki i zaokrągla się. *Rac1* powoduje ostateczną epitelizację, tj. polaryzację komórki i pojawienie się na niej złączy międzykomórkowych (*adherens junctions*) wraz z N-kadheryną. Odpowiedni optymalny poziom aktywnego *Rac1* w komórce jest potrzebny dla działania



paraxis w uruchomieniu pełnej epitelizacji. Wspólne działanie Cdc42 i Rac1 powoduje także przemieszczanie się komórek w obrębie somitomeru i rozdzielenie (sortowanie) komórek nabłonkowych od mezenchymatycznych [52]. Do zmiany kształtu komórek przyczynia się również działanie efryny (o czym niżej).

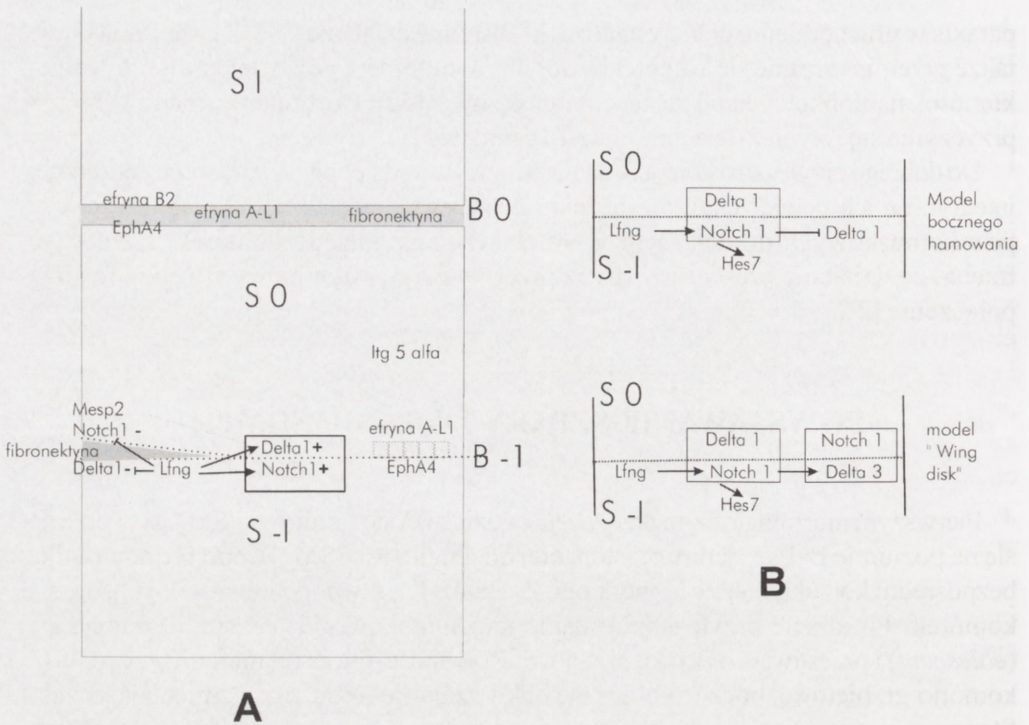
Do dobrego przylegania komórek nabłonkowych w czasie epitelizacji, oprócz obecności integrzyn na ich powierzchni, przyczynia się zapewne sygnalizacja Notch. Połączenie pozakomórkowych domen Delta i Notch wzmacnia adhezję komórek. Zaznaczyć trzeba, że działanie preseniliny (patrz niżej) w ciągu kilku minut niweluje to silne połączenie [2].

## POWSTAWANIE SZPARY I GRANIC SOMITU

Pierwszym morfologicznym przejawem oddzielania się somitu od PSM jest tworzenie się na poziomie B-1 szczeliny prostopadłej do długiej osi PSM. W obrębie niej zanika bezpośredni kontakt między komórkami. Zachodzi tu prawdopodobnie odpychanie się komórek. Po utracie przylegania u danio kaudalne komórki presomitu grupują się (*coalescent*) i przesuwają nieco ku przodowi. Równocześnie na rostralnym brzegu PSM komórki grzbietowe, boczne i brzuszne obkurczają się (retrakcja) i zmieniają kształt. Stanowią one następnie rostralny brzeg tworzącego się kolejnego somitu. W szparze gromadzi się substancja międzykomórkowa zawierająca fibronektynę [18].

Wykazano, że w tworzeniu się szpary biorą udział kadheryny, białka szlaków sygnalizacyjnych Eph/efryna oraz Notch. System Eph/efryna działa dwukierunkowo, zależnie od rodzaju efryny powoduje zwiększenie przylegania lub rozsuniecie się sąsiednich komórek. Efryny występują w dwóch postaciach, jedne są związane z błoną komórkową, drugie sekrecyjne są wydzielane z komórki. Zarówno efryny transbłonowe, jak i ich receptory Eph po aktywacji mogą jednocześnie przekazywać sygnał do komórek. Stąd związenie się takiej efryny z Eph może spowodować zmiany w obu komórkach biorących udział w przekazywaniu sygnału. System ten działający w dwóch kierunkach nazwano „*forward and reverse signaling*” [18,32]. Sekrecyjne efryny mogą działać jako negatywnie dominujące białka, gdyż mogą się wiązać z receptorami, lecz ich nie aktywują i nie powodują ich agregacji.

Transbłonowa efryna B2 zdolna do sygnalizacji śródkomórkowej oraz sekrecyjna efryna A-L1 obecne są na kaudalnym końcu S0 (tj. przyszłym kaudalnym końcu somitu I), a w rostralnej części S-I występuje receptor EphA4, zdolny do wiązania się z oboma rodzajami efryn (ryc. 8 A). Przed wytworzeniem szpary można uwidocznić efrynę B2 oraz receptor EphA4 w PSM w postaci dwóch równoległych prążków poprzecznych do osi A/P, początkowo oddzielonych od siebie pasmem pojedynczych komórek niezawierających tych białek. Położenie naprzeciw siebie liganda efryny B2 i receptora EphA4 umożliwia ich łatwe związanie. Aktywowany receptor EphA4 wpływa na cytoskielet i przez to ułatwia zmiany kształtu komórek i ich epitelizację. Powoduje bowiem polaryzację komórki i przybranie przez komórkę kształtu cylindrycznego,



RYCINA 8. Schemat tworzenia się szpary między S0 a S-I: A – rozmieszczenie Delta1, Notch1, Lfng, efryny i jej receptora EphA4 oraz fibronektyny, B – modele działania sygnalizacji Notch w tworzeniu szpary (wg Sato i współautorów [62] zmienione)

przesunięcie jąder komórkowych do jej części podstawowej, przemieszczenie się kateniny  $\beta$  do apikalnej części komórki. W nowowytworzonym somicie S-I efryny występują wyłącznie na bocznej jego krawędzi [18, 19].

W kaudalnej części presomitu S0 u danio gromadzi się fibronektyna [39]. Zarówno epitelizacja, jak i gromadzenie się fibronektyny zależą od integrzyn. W przyśrodkowej części presomitu wykryto ekspresję genu integryny *itg 5 $\alpha$* . Integryna ta współpracuje z systemem efryna/Eph dla utrzymania granic somitu. Działanie efryny może w tym obszarze powodować odpychanie się komórek na styku S-I i S0, a działanie kadheryn ich segregację w obrębie presomitu na dwa rodzaje nabłonkowe i mezenchymatyczne [41].

Niewątpliwym jest udział genów szlaku Notch w tworzeniu się szpary. Powstaje ona w miejscu, w którym stykają się ze sobą komórki o aktywnym Notch1 z komórkami o nieaktywnym Notch1. Takie rozgraniczenie komórek rozpoczyna się tworzyć na linii B-1, tj. między S-I a S0. W rostralnej części S-I gromadzi się Lfng, które w tym obszarze modyfikuje i aktywuje Notch1 i równocześnie hamuje ekspresję *dll1*. Ostra granica nagromadzenia mRNA *Lfng* na poziomie linii B-1 jest, jak się przypuszcza, nieodzowna dla wytworzenia szpary. Natomiast lokalizacja nieaktywnego Notch1 w S0 pokrywa się z obecnością MESP2 (ryc. 8 A). Aktywne Notch1 w komórkach na



rostralnym brzegu S-I łączy się z Delta1 na komórkach kaudalnego S0 i powoduje, że komórki w kaudalnej części S0 nie podlegają epitelizacji [18, 51, 59, 63].

Sato i wsp. [62] przypuszczają, że przy tworzeniu szpary sygnalizacja Notch może działać albo przez mechanizm „hamowania bocznego” lub/i przez mechanizm *wing disk* (tarczka imaginalna skrzydła). W mechanizmie hamowania bocznego Notch1 na komórkach rostralnego brzegu S-I wiąże się z Delta1 na powierzchni komórek kaudalnego brzegu S0 i hamuje w tych komórkach aktywność Notch. Równocześnie komórki brzegu rostralnego S-I produkują bliżej jeszcze nieznaną czynnikiem indukujący zmiany w komórkach kaudalnego S0. Czynnikiem takim nazwany został przez autorów segmenterem, być może jest nim Hes7 (ryc. 8 B). W mechanizmie *wing disk* Lfng modyfikując Notch1 w komórkach brzegu rostralnego S-I pobudza także ekspresję *delta3*. W takim przypadku dochodzi do równoczesnego wiązania się Notch1 z Delta 1, jak w modelu poprzednim, i do wiązania się Delta `3 zlokalizowanego na komórkach brzegu rostralnego S-I z Notch 1 na komórkach kaudalnego brzegu S0. W tym przypadku Lfng powodowałoby odmienną odpowiedź Notch 1 na działanie Delta1 i Delta 3 [62]. Obydwa te mechanizmy powodują powstanie dwóch rodzajów komórek – być może wzajemnie się odpychających.

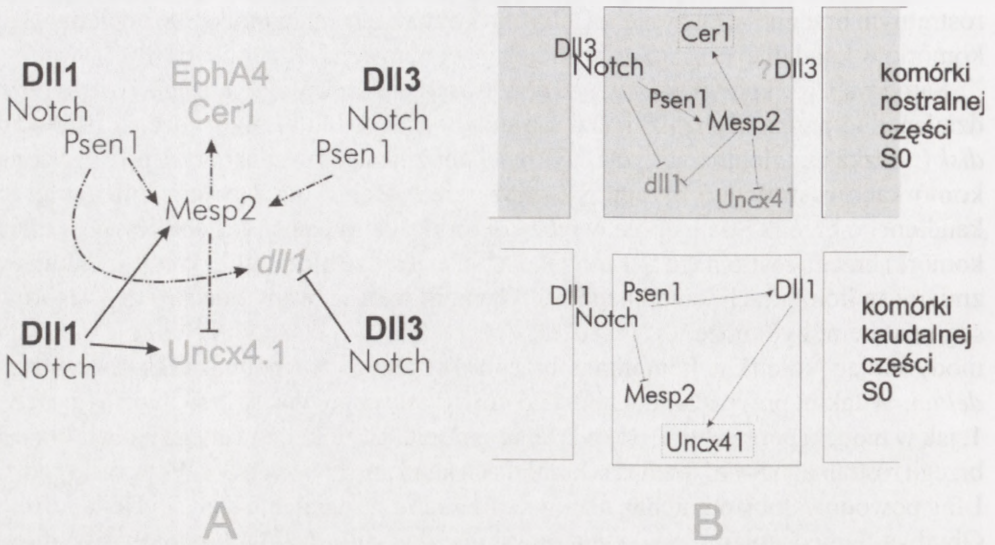
W ustalaniu położenia szpary odgrywa rolę także białko Sip1 (*Smad integrating protein1*), które zapobiega rozprzestrzenianiu się rostralnie (ku przodowi) FGF8, Wnt3a, Dll3, Tbx6, ale nie hamuje rozciągania się ku przodowi Lfng, Hes7, Dll1 i wpływa na granicę RA [48].

Szczególnie silne zdolności indukowania tworzenia się szpary mają komórki brzuszno-rostralne brzegu PSM. Komórki takie bowiem przeniesione w kaudalną, niesegmentowaną PSM indukują powstanie ektotopowej szpary. Komórki te działają w kierunku dogrzbiętowym niezależnie od tego, jak przeszczep został zorientowany. Przypuszczalnie w wytworzeniu szpary działają dwa odrębne jednokierunkowe sygnały, jeden w osi A/P, a drugi w osi D/V [63].

Kontakt PSM z narządami pierwotnymi, a szczególnie z ektoderłą powierzchniową jest także potrzebny dla powstania szpary. W tworzeniu jej instruktywną rolę grają komórki grzbietowej ektodermy zlokalizowane z tyłu linii B-1, prawdopodobnie indukując ekspresję genu *pcf15* kodującego paraxis. Natomiast komórki endodermy jelitowej stykające się z PSM mają jedynie właściwości permissyjne [63].

## POLARYZACJA SOMITU

Nowopowstały somit jest spolaryzowany wzdłuż dwóch osi: A/P i D/V. Polaryzacja D/V jest narzucona w pewnym stopniu już komórkom macierzystym tworzącym kohortę, jak już zaznaczono uprzednio. Polaryzacja wzdłuż osi A/P rozpoczyna się w rostralnej PSM dopiero po ustaniu oscylacyjnej ekspresji genów. Segregacja na komórki rostralne i kaudalne somitu ma miejsce na poziomie S-1, kiedy to pojawia się w presomicie mRNA molekularnych markerów somitu: rostralnego *papc* (*paraxial protocadherin C*) u danio, *cerr1* (*cerberus1*) u kury, *tbx18* u myszy oraz kaudalnego *myoD* (*myogenic determinant factor*) u danio, *uncx4.1* u myszy [10, 34, 67, 68,73].



RYCINA 9. Zmiany molekularne związane z segregacją komórek na rostralne i kaudalne somitu według przypuszczeń Kozumi i współautorów [43] oraz Takahasi i współautorów [72]: A – Sieć interakcji molekularnych między Dll1, Dll3, Mesp2 i preseniliną zachodzących w S-I, B – Odmienna regulacja sygnalizacji Notch w komórkach rostralnej i kaudalnej części presomitu S0. Sygnalizacja Notch z udziałem preseniliny zaznaczona przerywanymi liniami

Według Oates i Rhode [56] u danio polaryzacja somitu zachodzi w trzech etapach, najpierw wyodrębniają się komórki rostralne, po czym komunikują się z częściowo skaudalizowanymi sąsiadkami i indukują w nich pełną kaudalizację.

U myszy w polaryzacji A/P biorą udział Dll1, Dll3, Mesp2 oraz presenilina. Białka te tworzą w S-I skomplikowaną sieć interakcji molekularnych pomiędzy sąsiednimi komórkami (ryc. 9A). Dll1 i Dll3 ulegają ekspresji w rostralnej PSM. Jak już zaznaczono, ekspresja *mesp2* w presomicie S0 zostaje ograniczona do jego rostralnej części. Ograniczenie to spowodowane jest różną regulacją sygnalizacji Notch w rostralnej i kaudalnej części tego presomitu (ryc. 9B). W obrębie S0 następuje segregacja: Dll1 i Dll3. Dll1 lokuje się w komórkach kaudalnej części tego presomitu, a Dll3 w komórkach rostralnych, co wiąże się z ich odmiennymi funkcjami. Dll1 i Dll3 działają w dwóch różnych pętlach sprzężenia zwrotnego, jako antagoniści w wyznaczaniu rostralnej i kaudalnej części somitu. Do ich regulacji włącza się białko presenilina – Ps1 (*presenilin 1*)<sup>3</sup>. Dll3 wiążąc się bezpośrednio z Notch hamuje w części rostralnej ekspresję *dll1*. Natomiast Dll3 wiążąc się z Notch za pośrednictwem preseniliny zwiększa produkcję Mesp, które aktywuje geny markerów rostralnych *cer1* i *EphA4* oraz zawieszają ekspresję *uncx4.1*. W komórkach kaudalnej części S0 działa negatywna pętla sprzężenia zwrotnego przy pośrednictwie preseniliny, w której Dll1 indukuje ekspresję swojego własnego genu oraz *uncx4.1* [42, 73].

<sup>3</sup>Presenilina Ps1 – *presenilin*; transbłonowe białko, kodowane przez gen *Psen1* reguluje działanie receptora Notch, działa proteolitycznie jak  $\gamma$ -sekretaza, reguluje translokację śródkomórkowej domeny Notch [NICD] do jądra komórkowego.



Nie wiadomo, jakie jeszcze inne czynniki wpływają także na polaryzację somitu. U kury w rostralnej PSM zachodzi ekspresja genu *tbx18*, która następnie ogranicza się do rostralnej części somitu. U myszy *Tbx18* występuje w całej PSM [28].

## INFORMACJA POZYCYJNA SOMITÓW

Morfologiczne zróżnicowanie kręgów w obrębie kręgosłupa na szyjne, piersiowe, lędźwiowe, krzyżowe i ogonowe jest odbiciem informacji pozycyjnej, jaką uzyskują somity w czasie ich rozwoju. Informacja pozycyjna jest nadawana w dwóch wymiarach przednio-tylnym (rostralno-kaudalnym) i przyśrodkowo-bocznym (medio-lateralnym) [24]. Informację pozycyjną boczno-przyśrodkową uzyskują już komórki wyodrębniającej się kohorty (o czym już wyżej wspomniano). Informacja o położeniu przednio-tylnym decyduje o odmiennych właściwościach, czyli identyczność poszczególnych somitów i następnie kręgów. Ta informacja pozycyjna jest także wcześniej determinowana w somitogenezie. Jest zależna od czasu wyodrębniania się kohorty komórek macierzystych. Im później w rozwoju kohorta wyodrębnia się i im więcej cykli oscylacyjnych przejdzie w pączku ogonowym i kaudalnej PSM, tym bardziej kaudalny charakter ma powstały z niej somit. Informacja pozycyjna jest mocno „zapisana” w każdym rozwijającym się somicie. Wycinek PSM lub nowowytworzony somit przeszczepiony w inne ektotopowe miejsce (inny poziom) na osi A/P zachowuje zaprogramowaną identyczność pozycyjną i tworzy ektotopową strukturę, taką jakby rozwijał się w swoim normalnym miejscu. Komórki każdej kohorty są zdolne do interpretacji zewnętrznych sygnałów, ale tworzą strukturę według nadanej im informacji pozycyjnej [21].

Już stosunkowo dawno wykazano, że identyczność somitów jest w dużej mierze determinowana przez ekspresję genów tak zwanego kodu Hox [8, 43]. Geny te kodują czynniki transkrypcyjne zawierające domenę homeoboks. Charakteryzują się tym, że występują w 4 kompleksach zlokalizowanych na różnych chromosomach. Każdy kompleks obejmuje 9–13 genów paralogicznych<sup>4</sup>, ułożonych liniowo na chromosomie. Mutacje pojedynczych genów paralogicznych powodują homeotyczne zmiany somitu, to jest zmianę ich właściwości na bardziej kaudalne lub bardziej rostralne. Geny kodu Hox ulegają ekspresji w PSM i somitach zgodnie z zasadą kolinearności przestrzennej i czasowej w coraz większej liczbie w kierunku doogonowym. W somitomerach czaszkowych zachodzi ekspresja tylko pierwszych trzech (1–3) grup paralogicznych, a w somitach ogonowych wszystkich grup paralogicznych (1–13) [9].

Aktywacja genów Hox jest zależna od czasu powstawania kohorty i od jej położenia na osi A/P zarodka. Ekspresja genów Hox w somitogenezie myszy wg Cordes et al. [14] zachodzi w dwóch etapach. Prawdopodobnie już w komórkach prekursorowych PSM w smudze pierwotnej są aktywowane geny Hox i może zachodzić ich transkrypcja. W drugim etapie w rostralnej PSM po „przejściu” kohorty przez czoło determinujące,

<sup>4</sup> Geny paralogiczne mają taką samą strukturę, wzorzec transkrypcji i analogiczną funkcję, w ramach kodu Hox oznaczane są kolejnymi cyframi arabskimi.

zachodzi w jej komórkach definitywna ekspresja odpowiednich genów dla danego kolejno powstającego somitu. Jest ona przynajmniej częściowo kontrolowana przez sygnalizację Notch i związana jest z zegarem oscylacyjnym, które to mechanizmy zapewniają aktywację genów Hox odpowiednich dla danego segmentu. Interakcja między zegarem oscylacyjnym i genami Hox może ustanawiać poprawną koordynację kolejnego formowania się segmentów i ukierunkowywanie (specyfikację) ich wzdłuż osi A/P [23]. Są również dowody, że FGF8 i Wnt3a wpływają na ekspresję genów Hox. Poziom Wnt3a w smudze pierwotnej i pączku ogonowym może kontrolować, zgodnie z gradientem, kolejną ekspresję genów Hox, dostarczając informacji pozycyjnej komórkom wzdłuż osi A/P [3,4,16]. Aktywacja genów Hox jest zależna od czasu powstawania kohorty i od jej położenia na osi A/P zarodka.

## SYNCHRONIZACJA ROZWOJU SOMITÓW

Kolejne zmiany zachodzące w obrębie kohorty komórek począwszy od komórek macierzystych do uformowanego somitu są zsynchronizowane. Przypuszcza się, że tą synchronizację odpowiedzialna jest sygnalizacja Notch, jak wspomniano wyżej. Ponadto zsynchronizowane są przemiany w każdej parze tworzących się somitów, zarówno pod względem morfologicznym jak i przemian molekularnych. Mechanizm tej dwubocznej synchronizacji jest nieznan. Przypuszcza się, że bierze w niej udział kwas retinowy, ponieważ przy jego braku zostaje opóźniony rozwój somitów po prawej stronie, co także związane jest z desynchronizacją zegara oscylacyjnego [79]. Wnt3a działając jako sygnał o dalekim zasięgu może niwelować działanie mechanizmu kierującego odróżnieniem prawej i lewej strony zarodka, rozpoczynającym działanie już w węźle Henzena [52]. Symetria pary jest prawdopodobnie utrzymywana przy udziale czynnika transkrypcyjnego Cdx1 obecnego w komórkach somitu.

## UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione powyżej procesy molekularne zachodzące w czasie somitogenezy u kregowców są tylko czubkiem góry lodowej w stosunku do istotnych, ale niepoznanych jeszcze mechanizmów regulujących różnicowanie się somitów. Świadczą, jak bardzo złożone są mechanizmy powodujące różnicowanie się narządów w czasie rozwoju zarodkowego. Molekularny mechanizm, jaki kieruje zegarem oscylacyjnym, jest jeszcze daleki od pełnego wyjaśnienia. Dowodem mogą być doniesienia o udziale coraz to nowych genów w somitogenezie, jak np. u danio genu receptora fosfatazy  $\psi$  – RPTP $\psi$  (*receptor protein phosphatase*  $\psi$ ), którego ekspresja oscyluje w kaudalnej PSM [1]. Do wyjaśnienia zostaje wiele problemów, choćby takich, w jaki sposób zegar oscylacyjny jest tłumaczony na zmiany morfologiczne wyrażające się w tworzeniu oddzielnych segmentów? Czy zegar oscylacyjny może występować w trakcie różnicowania się innych narządów? Nie zaobserwowano go w segmentacji tyłomózgowia, która również



jest oparta na sygnalizacji Notch. Masamizu i współautorzy [49] przypuszczają, że oscylacja ekspresji genów może zachodzić w różnego rodzaju komórkach w różnych procesach biologicznych, lecz jest odmiennie regulowana niż w zegarze oscylacyjnym w somitogenezie. Ostatnio wykazano, że *in vitro* w fibroblastach myszy i w pewnych ustalonych liniach komórkowych geny *hes1* wykazują pulsacyjną ekspresję. Pulsacja ta jest jednak nieregularna i krótkotrwała [23, 49].

Morfogeneza somitów u kręgowców jest procesem konserwatywnym, można także przypuszczać na podstawie obserwacji przedstawicieli tylko 3 gromad, że również procesy molekularne kierujące somitogenezą są konserwatywne. U przebadanych gatunków somitogeneza opiera się na oddziaływaniu sygnalizacji Notch, Wnt i FGF oraz ich wzajemnej regulacji poprzez różnego rodzaju molekularne pętle sprzężenia zwrotnego. Model ten odbiega znacznie od powszechnie przedstawianego modelu molekularnego segmentacji u zarodków *Drosophila*, który opiera się o tak zwane geny segmentacyjne, geny reguły parzystej i geny polarności [39,43]. Somitogeneza bardziej zbliżona jest do przebiegu różnicowania się skrzydeł z dysków imaginalnych larw tego gatunku, w którym ważną rolę gra sygnalizacja Notch. Mało wiemy o mechanizmach kierujących segmentacją u bezkręgowców, nawet takich o wysokim stopniu metameryzacji jak pierścienice. Ostatnio ukazały się publikacje świadczące, że u niektórych pająków w segmentacji zarodka bierze udział kanoniczna sygnalizacja Notch oraz ulegają ekspresji geny homologiczne do aktywnych w somitogenezie [66,71].

Podziw dla natury budzi obserwowanie, jak jeden szlak sygnalizacyjny może być regulowany przez różne czynniki, na różnych poziomach translacji dając całkowicie odmienne, a niekiedy przeciwne efekty. Taka ekonomia komórkowa prowadzi do wykorzystywania jednego szlaku wielokrotnie w ciągu rozwoju w wielu różnorodnych procesach. Czy wobec tak skomplikowanych i subtelnych mechanizmów molekularnych i możliwości różnorodnych zmian w regulacji nawet jednego genu będzie możliwe łatwe wyprodukowanie z komórek macierzystych narządów *in vitro*?

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AERNE B, ISH-HOROWICZ D. Receptor tyrosine phosphatase  $\phi$  is required for Delta/Notch signalling and cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Development* 2004; **131**: 3391–3399.
- [2] AHIMOU F, MOK LP, BARDOT B, WESLEY C. The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signalling. *J Cell Biol* 2004; **167**: 1217–1220.
- [3] AULEHLA A, HERMANN BG. Segmentation in vertebrates clock and gradient finally joined. *Gen Dev* 2004; **18**: 2060–2067.
- [4] AULEHLA A, WEHRL E, BRAND-STABER I, KEMLER R, GOSSLER A, KANZLER B, HERMANN BG. Wnt3a plays a major role in segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell* 2003; **4**: 395–406.
- [5] BESSHO Y, HIRATA H, MASAMIZU Y, KAGEYAMA R. Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Gen Dev* 2003; **7**: 1451–1456.
- [6] BESSHO Y, SAKATA R, KOMATSU S, SHIOTA K, YAMADA S, KAGEYAMA R. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Gen Dev* 2001; **15**: 2642–2647.
- [7] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Pączek ogonowy. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 681–702.
- [8] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Zarys Organogenezy. Różnicowanie się komórek w narządach. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.

- [9] BURKE AC, CRAIG EN, MORGAN BM, TABIN C. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 1995; **121**: 333–346.
- [10] BUSSE M, PETRY M, SCHUSTER-GOSSLER K, LEITGES M, GOSSLER A, KISPERS A. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartment. *Gen Dev* 2004; **18**: 1209–1220.
- [11] CHRIST B, ORDAHL CP. Early stages of chick somite. *Anat Embryol* 1995; **191**: 381–396.
- [12] COLE SE, LEVORSE JM, TIGHMAN M, VOGT TF. Clock regulatory elements control cyclic expression of Lunatic fringe during somitogenesis. *Dev Cell* 2002; **3**: 75–84.
- [13] COOKE J, ZEEMAN EC. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J Theor Biol* 1976; **58**: 455–476.
- [14] CORDES R, SCUSTER-GOSSLER K, SERTH K, GOSSLER A. Specification of vertebral identity is coupled to Notch signalling and the segmentation clock. *Development* 2003; **131**: 1221–1233.
- [15] CORREIA KM, CONLON R. Surface ectoderm is necessary for the morphogenesis of the somites. *Mech Dev* 2000; **91**: 19–30.
- [16] DUBRULLE J, MCGREW MJ, POURQUIE O. Fgf signalling controls somite boundary position and regulate segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 2001; **106**: 219–232.
- [17] DUBRULLE J, POURQUIE O. *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning vertebrate embryo. *Nature* 2004; **427**: 419–422.
- [18] DUBRULLE J, POURQUIE O. Coupling segmentation to axis formation. *Development* 2004; **131**: 5783–5793.
- [19] DURBIN L, BRENNAN C, SHIOMI K, COOKE J, BARRIOS A, SHANMUGALINGAM S, GUTHRIE B, LINDBERG R, HOLDER N. Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Gen Dev* 1998; **12**: 3096–3109.
- [20] ELOY-TRINQUET S, NICOLAS JF. Cell coherence during production of the presomitic mesoderm and somitogenesis in the mouse embryo. *Development* 2002; **129**: 3609–3619.
- [21] FOMENOU MD, SCAAL M, STOCKDALE FE, CHRIST B, HUANG R. Cells and all somitic compartments are determined with respect to segmental identity. *Dev Dyn* 2005; **233**: 13876–1393.
- [22] FORSBERG H, CROZET F, BROWN NA. Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycle at two intervals, precede somite boundary formation. *Curr Biol* 1998; **8**: 1027–1030.
- [23] FREITAS C, RODRIGUES S, SAUDE L, PALMEIRIM I. Running after the clock. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 317–324.
- [24] FREITAS C, RODRIGUES S, CHARRIER JB, TEILLET MA, PALMEIRIM I. Evidence for medial/lateral specification and positional information within the presomitic mesoderm. *Development* 2001; **128**: 5139–5147.
- [25] GAJEWSKI M, SIEGER D, ALT BA, LEVE C, HANS S, WOLFF C, ROHR KB, TAUTZ D. Anterior and posterior waves of cyclic *her1* gene expression are differentially regulated in the presomitic mesoderm of zebrafish. *Development* 2003; **130**: 4269–4278.
- [26] GALCERAN J, SUSTMANN C, HSU SC, FOLBERTH S, GROSSCHEDL R. LEF1-mediated regulation of *Delta-like 1* links WNT and Notch signaling in somitogenesis. *Gen Dev* 2004; **18**: 2718–2723.
- [27] MCGREW MJ, DALE JK, FRABOULET S, POURQUIE O. The *Lunatic Fringe* gene is target of the molecular clock linked to segmentation in avian embryo. *Curr Biol* 1998; **8**: 979–982.
- [28] HENRY CA, URBAN MK, DILL KK, MERLIE JP, PAGE MF, KIMMEL CB, AMACHER SL. Two linked *hairy/Enhancer-of-split-related* zebrafish genes, *her1* and *her7* function together to refine alternating somites boundaries. *Development* 2002; **129**: 3693–3704.
- [29] HAENIG B, KISPERS A. Analysis of Tbx18 expression in chick embryo. *Dev Genes Evol* 2004; **214**: 407–411.
- [30] HIRATA H, BESSHO Y, KOKUBU H, MASAMIZU Y, YAMADA S, LEWIS J, KAGEYAMA R. Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nat Genet* 2004; **36**: 750–754.
- [31] HOFMANN M, SCHUSTER-GOSSLER K, WATANABE-RUDOLPH M, AULEHLA A, HERRMANN BG, GOSSLER A. WNT signalling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signalling by regulating *Dll1* expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Gen Dev* 2004; **18**: 2712–2717.
- [32] HOLDER N, KLEIN R. Eph receptors and ephrins; effectors of morphogenesis. *Development* 1999; **126**: 2033–2044.
- [33] HOLLEY SA, GEISLER R, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by a *Delta*-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Gen Dev* 2000; **14**: 1678–1690.
- [34] HOLLEY SA, JULICH D, RAUCH GJ, GOSSLER R, NÜSSLEIN-VOLHARD C. *her1* and the *notch* pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development* 2002; **129**: 1175–1183.



- [35] ISHIKAWA A, KITAJIMA S, TAKAHASHI Y, KUKOBO H, KANNO J, INOUE TR, SAGA Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev* 2004; **121**: 1443–1453.
- [36] JOUVE C, IIMURA T, POURQUIE O. Onset of the segmentation clock in the chick embryo evidence for oscillation's in somite precursors in the primitive streak. *Development* 2002; **129**: 1107–1117.
- [37] JOUVE C, PALMEIRIM I, HENRIQUE D, BECKERS J, GOSSLER A, ISH-HOROWICZ D, POURQUIE O. Notch signaling is required for cyclic expression of hairy-like gene *HES1* in the presomitic mesoderm. *Development* 2000; **127**: 1421–1429.
- [38] JULICH D, GEISLER R, HOLLEY SA. Integrin alpha5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somatogenesis. *Dev Cell* 2005; **8**: 575–586.
- [39] JURA C, KLAG J [red.] Podstawy embriologii zwierząt i człowieka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- [40] KAWAHARA A, CHE YS, HANAOKA R, TAKEDA H, DAWID IB. Zebrafish *GADD45b* genes are involved in somite segmentation. *PNAS* 2005; **102**: 361–366.
- [41] KOSHIDA S, KISHIMOTO Y, USTUMI H, SHIMIZU T, FURUTANI-SEIKI N, KONDOH H, TAKADA S. Integrin alpha-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev Cell* 2005; **8**: 587–598.
- [42] KOIZUMI K, NAKAJIMA M, YUASA S, SAKAI T, KURIYAMA T, SHIRASAWA T, KOSEKI H. The role of presenilin 1 during segmentation. *Development* 2001; **128**: 1391–1402.
- [43] KRZANOWSKA H, SOKOŁ-MISIAK W. [red.] Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [44] KUME T, HANG HY, TOPCZEWSKA JM, HOGAN BLM. The murine winged helix transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are both required for cardiovascular development and somitogenesis. *Gen Dev* 2001; **15**: 2470–2482.
- [45] LE BORGNE R, REMAUDS, HMEL S, SCHWEISGUTH F. Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulations of Delta and Serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* 2005: e96.
- [46] MADEN M, SONNEVELD E, van den SAAG PT, GALE E. The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo implications for developmental mechanisms. *Development* 1998; **125**: 4133–4144.
- [47] MAROTO M, DALE KJ, DEQUEANT ML, PETIT AC, POURQUIE O. Synchronised cycling gene oscillations in presomitic mesoderm cells require cell-cell contact. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 309–315.
- [48] MARUHASHI H, van de PUTTE T, HUYLEBROECK D, KONDOH H, HIGASHI Y. Involvement of SIP1 in positioning of somites boundaries in the mouse embryo. *Dev Dyn* 2005; **234**: 332–338.
- [49] MASAMIZU Y, OHTSUKA T, TAKASHIMA Y, NAGAHARA H, TAKENEKA Y, YOSHIKAWA K, OKAMURA H, KAGEYAMA R. Real-time imaging of the somite segmentation clock: Revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *PNAS* 2005; **103**: 1313–1318.
- [50] MORALES AV, YASUDA Y, ISH-HOROWICZ D. Periodic Lunatic fringe expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to Notch signaling. *Dev Cell* 2002; **3**: 63–74.
- [51] MORIMOTO M, TAKAHASHI Y, ENDO M, SAGA Y. The Mesp2 transcription establishes segmental borders suppressing Notch activity. *Nature* 2005; **435**: 354–359.
- [52] NAKAYA Y, KURODA S, KATAGIRI YT, KAIBUCHI K, TAKAHASHI Y. Mesenchymal-epithelial transition during somite segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell* 2004; **7**: 425–438.
- [53] NIKAIDO M, KAWAKAMI A, SAWADA, FURUTANI-SEIKI M, TAKEDA H, ARAKI K. *Tbx24*, encoding a T-Box protein, is mutated in the zebrafish somite – segmentation mutant *fused somites*. *Nature Gen* 2002; **31**: 195–199.
- [54] NICOLAS JF, MATHIS L, BONNEROT C, SAURIN W. Evidence in the mouse for self renewing stem cell in the formation of segmented longitudinal structure, the myotome. *Development* 1995; **122**: 2933–296.
- [55] OATES AC, HO RK. *Hairy/E(spl)-related (Her)* genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signalling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish. *Development* 2002; **129**: 2929–2946.
- [56] OATES AC, RHODE LA, HO RK. Generation of segment polarity in the paraxial mesoderm of the zebrafish through a T-box-dependent inductive event. *Dev Biol* 2005; **283**: 204–214.
- [57] PALMEIRIM I, HENRIQUE D, ISH-HOROWICZ D, POURQUIE O. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 1997; **91**: 639–648.
- [58] PASINI A, JIANG YJ, WILKINSON DG. Two zebrafish Notch-dependent *hairy/Enhancer-of-split-related* genes *her6* and *her4*, are required to maintain the co-ordination of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Development* 2003; **131**: 1529–1541.

- [59] POURQUIE O. Vertebrate somitogenesis a novel paradigm for animal segmentation? *Int J Dev Biol* 2003; **47**: 597–503.
- [60] POURQUIE O, KUSUMI K. When body segmentation goes wrong. *Clin Genet* 2001; **60**: 409–416.
- [61] POURQUIE O, TAM PPL. A nomenclature for prospective somites and phases of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Dev Cell* 2001; **1**: 619–620.
- [62] SAKAI Y, MENO C, FUJII H, NISHINO J, SHIRATORI H, SAJJOH Y, ROSSANT J, HAMADA H. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterior-posterior axis within the mouse embryo. *Gen Dev* 2001; **15**: 213–225.
- [63] SATO Y, YASUDA K, TAKAHASI Y. Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and notch during somitic segmentation. *Development* 2002; **129**: 3633–3644.
- [64] SAWADA A, FRITZ A, JIANG YJ, YAMAMOTO A, YAMASU K, KUROIWA A, SAGA Y, TAKEDA H. Zebrafish *Mesp* family genes, *mesp-a* and *mesp-b* are segmentally expressed in the presomitic mesoderm. And *Mesp-b* confers the anterior identity to the developing somites. *Development* 2000; **127**: 1691–1702.
- [65] SAWADA A, SHINHYA M, JIANG YJ, KAWAKAMI A, KUROIWA A. Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 2001; **128**: 4873–4880.
- [66] SCHOPPEMEIER M, DAMEN WG. Suppressors of Hairless and presenelin phenotypes imply involvement of canonical Notch signaling in segmentation of the spider *Cupiennius salei*. *Dev Biol* 2005; **280**: 1211–1224.
- [67] SERTH K, SCHUSTER-GOSSLER K, CORDES R, GOSSLER A. Transcriptional oscillation of Lunatic fringe is essential for somitogenesis. *Gen Dev* 2003; **17**: 912–925.
- [68] SHAWLOT W, DENG JM, BEHRINGER RR. Expression of the mouse cerberus related gene, *Cerr1*, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6198–6203.
- [69] SIEGER D, TAUTZ D, GAJEWSKI M. The role of the Suppressor of Hairless in Notch mediated signaling during zebrafish somitogenesis. *Mech Dev* 2004; **120**: 1083–1094.
- [70] SIEGER D, TAUTZ D, GAJEWSKI M. Her11 is involved in the somitogenesis in zebrafish. *Dev Genes Evol* 2004; **214**: 393–406.
- [71] STOLLEWERK A, SCHOPPEMEIER M, DAMEN WG. Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. *Nature* 2003; **423**: 863–865.
- [72] TAKAHASI Y, KITAJIMA S, INOUE T, KANNO J, SAGA Y. Differential contributions of *Mesp1* and *Mesp2* to the epithelization and rostro-caudal patterning of somites. *Development* 2005; **132**: 787–796.
- [73] TAKAHASI Y, INOUE T, GOSSLER A, SAGA Y. Feedback loops comprising *Dll1*, *Dll3* and *Mesp2*, and differential involvement of *Psen1* are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* 2003; **130**: 4259–4268.
- [74] TAM PPL, BEDINGTON RSP. The formation of the mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* 1987; **99**: 109–106.
- [75] TAM PPL, TAN SS. The somitogenetic potential of cells in the primitive streak and tail bud of the organogenesis – stage mouse embryo. *Development* 1992; **115**: 703–715.
- [76] TAM PPL, TRAINOR A. Specification and segmentation of the paraxial mesoderm. *Anat Embryol* 1994; **189**: 275–305.
- [77] TOPCZEWSKA JM, TOPCZEWSKI J, SHOSTAK A, KUME T, SOLNICA-KREZEL L, HOGAN BLM. The winged helix transcription factor *Foxc1a* is essential for somitogenesis in zebrafish. *Genes Dev* 2001; **15**: 2483–2490.
- [78] TWYMAN TM. Krótkie wykłady, Biologia rozwoju. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [79] VERMOT J, POURQUIE O. Retinoic acid co-ordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature* 2005; **435**: 1215–1220.
- [80] WHITE PH, CHAPMAN DL. *Dill1* is a downstream target of *Tbx6* in the paraxial mesoderm. *Genesis* 2005; **42**: 193–202.
- [81] YOON JK, WOLD B. The bHLH regulator *pMesogenin 1* is required for maturation and segmentation of paraxial mesoderm. *Gen Dev* 2000; **14**: 3204–3214.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.04. 2006 r.

Przyjęto: 10.05. 2006 r.

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa



## 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 gastrulacji 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](mailto: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 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

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/y .....egz./kmpł .....„Postępów Biologii Komórki”.  
Kwotę .....złoty (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*

---

## 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-

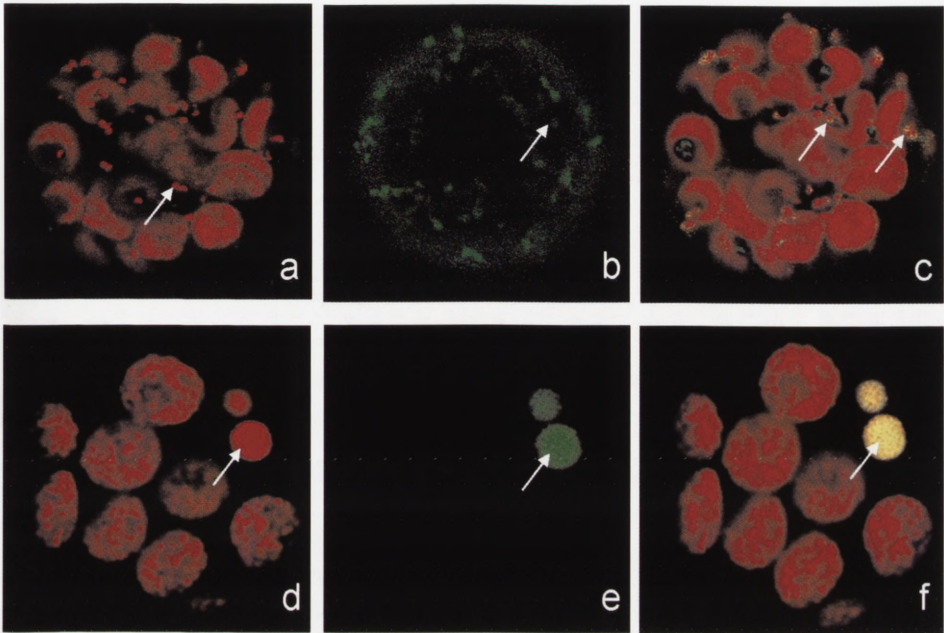
Za zaistniałą pomyłkę serdecznie przepraszamy Czytelników i Autorów.



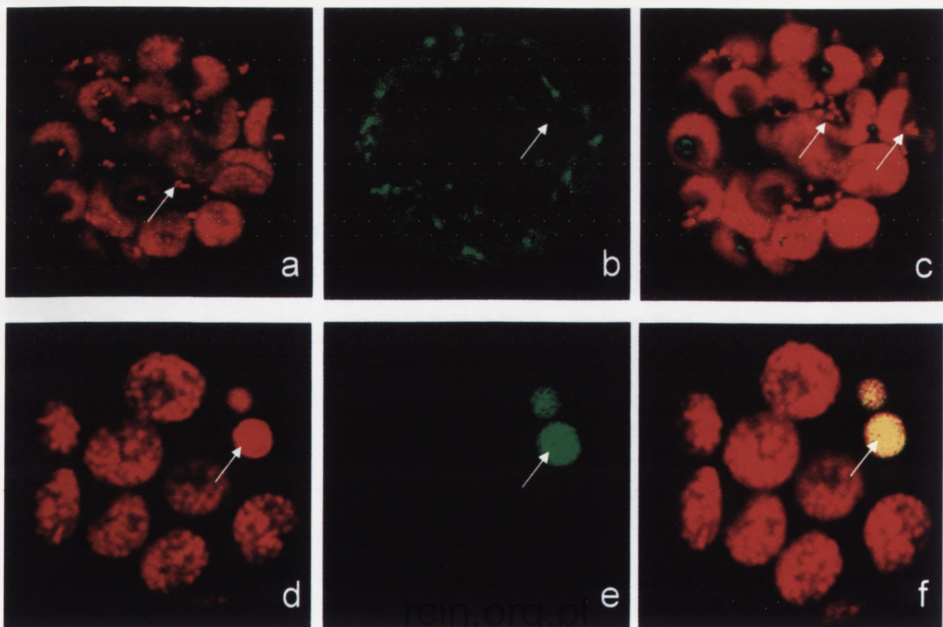
## Errata

Errata do artykułu autorstwa: J. Kozioł-Lipińskiej, E. Simeonowej i A. Mostowskiej, pt. *Czy mitochondria indukują programowaną śmierć komórki w roślinach?* opublikowanego w *Postęпах Biologii Komórki* z 2006 r. t. 33, nr 1 s. 81-94.

Na str. 85 zamieszczono ryc. 1 w następującej postaci



Powinna ona mieć postać następującą:



## 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 lub płycie. 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 B<sub>5</sub>.

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,  
 email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)  
 na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,  
 IV O/Warszawa 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, email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl).  
 On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
 ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,  
 IV O/Warszawa, No 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 biologii komórki. Nadesłane manuskrypty są recenzowane. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biologii komórki, 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 konieczne 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.424) powinna być przysłana 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 stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie 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 tytułkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekstu można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. 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 niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko I. 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. **Odpłatność za artykuł nieprzekraczający 15 str. druku wynosi 300,- zł.**

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 lub płycie

z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego

Jest zgoda osób, których informacje nie-

z komputera IBM

**tak nie**

publikowane są zamieszczone w tekście

Odpowiadam za całość pracy opisanej w załączonym maszynopisie

**tak nie**

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

*podpisy wszystkich autorów*

## TREŚĆ – CONTENT

W tym Zeszyście	181
JURKIEWICZ D., POPOWSKA E., TYLKI-SZYMAŃSKA A., KRAJEWSKA-WALASEK M.: Molekularne mechanizmy powstawania zespołu Retta Molecular mechanisms in Rett syndrome	183
MŁODZIŃSKA E., KŁOBUS G.: Pompy protonowe plazmolemy i ich regulacja w komórkach roślinnych The plasma membrane proton pumps and their regulation in plant cells	197
WIELGAT P., BRASZKO J.J.: Udział receptorów angiotensyny AT1, AT2 i AT4 w regulacji procesów poznawczych Participation of the angiotensin receptors AT1, AT2 and AT4 in regulation of cognitive processes	213
ZAWILSKA J.B., CZARNECKA K.: Melanopsyna – nowo odkryty chronobiologiczny receptor światła Melanopsin: a newly discovered photoreceptor controlling circadian rhythms	229
DEPTUŁA W., NIEDŹWIEDZKA P., TOKARZ-DEPTUŁA B.: Czynniki działające hamująco na TLR (receptory Toll-podobne) The factors of negative regulation of TLR (Toll-like receptors)	247
STACHURSKA A., WRONKA M., KOWALCZYŃSKA H.M.: Rak gruczołu krokowego w badaniach <i>in vitro</i> : Charakterystyka linii komórkowych PC3, DU145 i LNCaP <i>In vitro</i> studies on prostate cancer: Characteristics of PC3, DU145 and LNCaP cell lines	257
WŁODARSKI K.H., WŁODARSKI P.: Fuzja prekursorów osteoklastów oraz regulacja aktywności osteoklastów dojrzałych Osteoclast precursor cell fusion and regulation of mature osteoclasts' activity	273
KOSZUCKA A.M., DĄBROWSKA G.: Roślinne metalotioneiny – Plant metallothioneins	285
BASAK G.W., LASEK W.: Interleukina 15: Charakterystyka i aktywność w warunkach fizjologicznych Interleukin 15: General characteristics and activity in physiological conditions	303
BASAK G.W., LASEK W.: Rola interleukiny 15 w patogenezie oraz terapii chorób człowieka Role of interleukin 15 in pathogenesis and therapy of human diseases	327
KIELBOWICZ-MATUK A.: Roślinne immunofiliny – Struktura i funkcje Plant immunophilins – Structure and functions	349
KRAWCZYK B., RYCHLEWSKI P., FABIANOWSKA-MAJEWSKA K.: PTEN – białko supresorowe: regulacja aktywności białka i ekspresji genu PTEN – tumour suppressor protein: regulation of protein activity and gene expression	365
STĘPIEŃ A., GRZANKA A., SZPECHCIŃSKI A.: Struktury cytoszkieletu aktywnego formowane przy krawędzi wiodącej komórki podczas pierwszego etapu migracji Cytoskeletal actin structures formed at the leading edge of the migrating cell during the first step of migration	381
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z.: Molekularny zegar i gradient morfogenów regulują somitogenezę u kręgowców – Molecular oscillatory clock and morphogen gradient regulate the somitogenesis in vertebrates	393
Informacja o nowych książkach i Oferta wydawnicza	419
Komunikaty i Errata	422
Wskazówki dla autorów i warunki prenumeraty	424